

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



František Sklenář

Mechanismy adaptace vláknitých hub na vodní stres

Mechanisms of water stress adaptations of the filamentous fungi

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vít Hubka

Praha, 2014

Poděkování

Na prvním místě děkuji Mgr. Vítu Hubkovi za pomoc s vyhledáváním odborné literatury a laboratorní činností, dále za podnětné připomínky při vytváření mé bakalářské práce a velké množství času, které strávil jejím kontrolováním. Můj dík za ochotnou pomoc a odborné rady patří také Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D. a doc. RNDr. Jiřímu Gabrielovi, DrSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití uvedené literatury a že veškerá citovaná literatura je v práci uvedena. Tato práce ani žádná její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.5.2014

Podpis:

Abstrakt

Některé druhy vláknitých hub dokáží růst na substrátech s nízkou vodní aktivitu, které buď obsahují málo vody, nebo mají vysoký obsah osmoticky aktivních látek. Tyto houby jsou nejčastěji označovány jako osmotolerantní nebo xerotolerantní. Vyskytují se zejména v půdě v aridních oblastech a v hypersalinních prostředích. Ekonomicky významné jsou druhy znehodnocující skladované potraviny, osivo a krmivo. Předkládaná práce přináší přehled fyziologických a morfologických adaptací houbových organismů na vodní stres a zabývá se i jejich molekulárně genetickým podkladem. Je také uveden přehled taxonomického zařazení houbových organismů přizpůsobených růstu při nízké vodní aktivitě. Samostatné kapitoly jsou věnovány vlivu odlišných osmoticky aktivních látek na fenotyp hub a možnostem využití médií s osmoticky aktivními látkami pro taxonomické účely.

Klíčová slova: adaptace na osmotický stres, osmoticky aktivní látky, osmotolerance, vodní aktivita, xerotolerance

Abstract

Some species of the filamentous fungi can grow on the substrates with low water activity that have either low water content or high concentration of osmotically active substances. These fungi are usually called osmotolerant or xerotolerant. They occur particularly in the soil of arid areas and in hypersaline environments. Economically important species cause spoilage of stored food, seed and feed. This thesis brings the summary of physiological and morphological adaptations of fungal organisms to water stress and deals with the molecular genetic background of these adaptations. The current taxonomic classification of the fungal organisms adapted to grow at low water activity is summarized. Separate chapters are dedicated to the influence of different osmotically active substances on the phenotype of the fungi and to the possibilities of using media with osmotically active substances for taxonomic purposes.

Key words: osmotic stress adaptation, osmotically active substances, osmotolerance, water activity, xerotolerance

Obsah

Úvod	2
1. Vodní aktivita.....	3
2. Terminologie vztahující se k odolnosti vůči osmotickému stresu.....	4
3. Taxonomická klasifikace vláknitých hub tolerujících nízkou vodní aktivitu substrátu	6
4. Ekonomický význam a patogenita osmotolerantních organismů z říše Fungi.....	9
5. Adaptace hub k vodnímu stresu	10
6. Molekulárně genetická podstata adaptací.....	13
6.1. Modelové organismy a metody studia.....	13
6.2. Signalizace a odpověď na osmotický stres	14
6.2.1. Signalizační dráha HOG (High Osmolarity Glycerol response)	14
6.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a <i>Debaryomyces hansenii</i>	15
6.2.3. <i>Aspergillus nidulans</i>	17
6.2.4. <i>Hortaea werneckii</i>	19
6.2.5. <i>Wallemia ichthyophaga</i>	20
7. Vliv nízké vodní aktivity substrátu na fenotyp hub	22
7.1. Morfologické změny	22
7.2. Vliv různých osmoticky aktivních látek.....	24
8. Využití osmotolerance v taxonomii.....	25
Závěr	29
Přehled použité literatury	30

Úvod

V říši Fungi se nachází mnoho zástupců schopných přežívat a růst za velmi nepříznivých podmínek prostředí (Gostinčar et al. 2010). Někteří z nich tyto podmínky přímo vyhledávají (v podmínkách běžných pro ostatní druhy růst nedokáží) a využívají snížené kompetice v takovém prostředí. Jedním ze stresů, který na organismy působí, je nízká dostupnost vody. Ta může být způsobena buď její nepřítomností, nebo vysokou koncentrací rozpuštěných, osmoticky aktivních, organických i anorganických látek. Druhy, které jsou schopny se s takovými podmínkami vyrovnat, nazýváme nejčastěji xerotolerantní, nebo osmotolerantní (Hooley et al. 2003). Stále jsou objevována další místa na Zemi, ze kterých byly dlouho známy pouze prokaryotické organismy, ale ve skutečnosti jsou osídleny i některými druhy hub, které dokáží tolerovat tyto extrémní podmínky (Gunde-Cimerman et al. 2009). Jejich adaptace lze hodnotit z hlediska fyziologie a morfologie, které mají podklad na buněčné úrovni, tedy v reakci na stresové podmínky zprostředkované buněčnou signalizací a aktivací přepisu cílových genů. Mechanismy osmotolerance byly nejvíce studovány na kvasinkových modelových organismech, především na *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann 2002). Tato kvasinka má nesporné výhody jako genetický model, její osmotolerance ale není příliš velká a adaptace se liší u hub s vláknitým růstem. Proto byly v nedávné době zkoumány další modelové organismy, jejichž osmotolerance je vyšší, a které patří mezi vláknité houby (Lenassi et al. 2013, Zajc et al. 2013).

Hlavním cílem této práce je shrnout poznatky o adaptacích na nízkou vodní aktivitu substrátu, jejich molekulárně genetickém pozadí a vlivu nízké vodní aktivity na fenotyp vláknitých hub z oddělení Ascomycota a Basidiomycota a porovnání s kvasinkovými modelovými organismy. Dále je podán přehled taxonomické příslušnosti osmotolerantních druhů do řádů a je zhodnocen jejich ekonomický význam. Uveden je také přehled médií nejčastěji užívaných pro kultivaci osmotolerantních hub.

1. Vodní aktivita

Voda je základní podmínkou života. Pro živé organismy však není důležitá pouze její přítomnost, ale také využitelnost, protože např. ve formě ledu jí přijímat nemohou. K vyjádření dostupnosti vody pro organismy v konkrétním substrátu se dají využít fyzikální veličiny vodní potenciál, nebo vodní aktivita.

Vodní potenciál (Ψ) je v biologii používán hlavně rostlinnými fyziology, je udáván v Pascalech a obsahuje několik složek – osmotickou, tlakovou, gravitační a matriční. Vodní potenciál čisté vody je nula a pokud se voda stává méně dostupnou (např. zvyšováním koncentrace solí), tak se jeho hodnota snižuje (Taiz et Zeiger 2010).

Vodní aktivita (a_w) byla zavedena v roce 1957 (Scott) a více se využívá v mikrobiologii. Aktivita vody je definována jako podíl tlaku vodní páry dané látky a čisté vody. Jedná se o bezrozměrné číslo. Aktivita čisté vody je 1 a se snižující se dostupností vody klesá i vodní aktivita substrátu.

$$a_w = p_s/p_w$$

Pokud známe hodnotu vodní aktivity, můžeme vypočítat hodnotu vodního potenciálu a naopak podle následujícího vzorce, kde R je univerzální plynová konstanta, T absolutní teplota a W_A je molekulární hmotnost vody. Vztah mezi vodní aktivitou a vodním potenciálem je znázorněn v tabulce 1.

$$\Psi = 1000RT/W_A \ln(a_w)$$

Protože však hodnotu vodního potenciálu i vodní aktivity získáme jedině měřením pomocí speciálních přístrojů, které nejsou vždy dostupné, často se uvádí pouze koncentrace rozpuštěného solutu (např. NaCl nebo glycerolu) v molech nebo v procentech. Takto získáme **relativní hodnotu vodní aktivity**, kterou lze snadno zopakovat (Cantrell et al. 2006).

Někteří zástupci říše Fungi tolerují podmínky s vodní aktivitou až do 0,6 (Pitt et Hocking 2009). Např. *Xeromyces bisporus* stále roste při vodní aktivitě 0,61 (Leong et al. 2011).

Tabulka 1. Vztah mezi vodní aktivitou a vodním potenciálem při 25°C (Mueller et al. 2004).

Vodní aktivita	Vodní potenciál (MPa)	Vodní aktivita	Vodní potenciál (MPa)
0,999	-0,138	0,70	-49,1
0,995	-0,69	0,65	-59,3
0,99	-1,38	0,60	-70,3
0,98	-2,78	0,50	-95,4
0,97	-4,19	0,40	-126
0,96	-5,62	0,30	-165
0,95	-7,06	0,20	-221
0,90	-14,5	0,10	-317
0,85	-22,4	0,01	-634
0,80	-30,7	0,001	-951
0,75	-38,6		

2. Terminologie vztahující se k odolnosti vůči osmotickému stresu

Pro houby, které tolerují podmínky se sníženou aktivitou vody, se používá několik označení. Prvním z těchto pojmů je **xerofilní**. Pitt (1975) definoval jako xerofilní ty houby, které jsou schopné růst při vodní aktivitě 0,85 a nižší. Zároveň by měly růst rychleji v podmínkách s vodní aktivitou nižší než 1. Pokud dokáží růst pouze v rozmezí a_w od 1 do 0,85, nebo pokud sice tolerují i nižší vodní aktivitu než 0,85, ale jejich růst nejrychlejší při nejvyšší vodní aktivitě (tzn. 1 nebo 0,99), jedná se o druhy **xerotolerantní**.

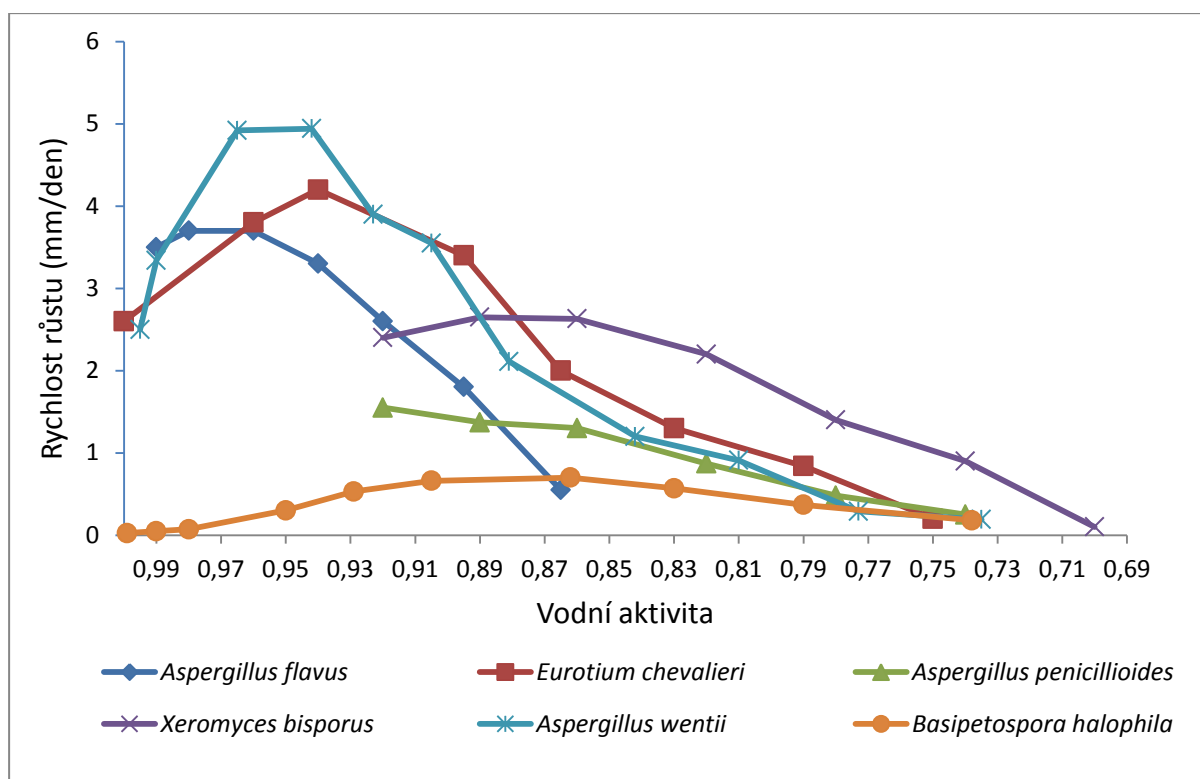
Pojem **osmofilní** se opět používá pro houby, které dokážou růst na substrátech s nízkou vodní aktivitou a rostou pomaleji při vysoké vodní aktivitě. Zatímco pojem xerofilní se používá pro houby rostoucí v prostředích s nedostatkem vody (např. půda v aridních oblastech, skalnaté oblasti, nebo ledovce voda je v nedostupné formě), osmofilní houby obývají prostředí, kde ke snížení vodní aktivity vede vysoký osmotický potenciál vody (tzn. voda s rozpuštěnými solemi nebo organickými látkami, např. hypersalinní vody slaných jezer nebo příbřežních oblastí). Výsledná vodní aktivita může být stejná, ale její příčina se liší (v případě vodního potenciálu se mění odlišné složky) (Mueller et al. 2004).

Osmotolerantní druhy nejrychleji rostou v podmínkách s vysokou vodní aktivitou, ale dovedou růst i v podmínkách s nízkou vodní aktivitou.

Mezi pojmy xerofilní a osmofilní je z hlediska ekologie zdánlivě nezanedbatelný rozdíl, protože zástupci obou skupin by se měli vyskytovat v odlišných podmínkách. Přesto

v literatuře není mezi těmito pojmy zvlášť rozlišováno a jejich použití většinou není příliš zdůvodňováno. Je to způsobeno zejména tím, že část hub, tolerujících nízkou vodní aktivitu substrátu může být zařazena mezi obě skupiny. Dalšími důvody může být ne úplně jednoznačná definice a také fakt, že pojmy nemají jasný vztah k taxonomickým skupinám. Navíc při kultivaci v in vitro podmínkách není nutné příliš dbát na to, kterým z těchto pojmů danou houbu označíme. Dá se říct, že pro většinu dále zmiňovaných organismů bude nejvhodnější označení osmotolerantní, přičemž v určitých případech lze použít i jiný pojem, který lépe vystihuje ekologické nároky dané houby. Na obr. 1 vidíme růstové rychlosti několika druhů, které můžeme označit jako osmofilní, nebo xerofilní.

Často používané je také označení halofilní a halotolerantní. Jedná se o houby, které dokáží tolerovat vysoké koncentrace solí a iontů, zejména NaCl, v podstatě se jedná o typ osmofilie, nebo osmotolerance. Halotolerantní druhy se musejí vyrovnat s nepříznivým vlivem iontů, které mohou inhibovat enzymové aktivity. Těchto hub je poměrně velké množství a tolerance k NaCl je zkoumána již relativně dlouho, píše o nich např. Chen (1964). Zájem o tyto houby vzrostl na přelomu tisíciletí, kdy bylo objeveno mnoho nových druhů žijících v příbřežních mořských oblastech (nebo byly tyto oblasti určeny jako primární habitaty u dříve známých druhů) (Gunde-Cimerman et al. 2000, Gunde-Cimerman et al. 2006). Jako halofilní jsou označovány houby izolované z prostředí s koncentrací NaCl vyšší než 10% a schopné růstu v médiu s koncentrací vyšší než 17% NaCl (tzn. $a_w = 0,85$ a nižší). Jako halotolerantní bývají označovány houby, izolované z vody s nízkou koncentrací soli (pod přesahuje 10%), které ale in vitro dokáží růst i v médiu se 17% NaCl (Gunde-Cimerman et al. 2006).



Obrázek 1. Závislost rychlosti růstu na vodní aktivitě u 6 osmofilních, respektive xerofilních druhů. Kultivace všech druhů probíhala při 25°C (ne pro všechny je tato teplota optimální), vodní aktivita média byla upravena přidáváním směsi glukózy a fruktózy, pouze u halofilního druhu *Basipetospora halophila* přidáváním NaCl. Převzato a upraveno podle Pitt a Hocking (1977), Andrews a Pitt (1987), Gock et al. (2003).

3. Taxonomická klasifikace vláknitých hub tolerujících nízkou vodní aktivitu substrátu

Xerotolerantní a osmotolerantní houby se vyskytují zejména ve dvou prostředích. Zprv se jedná o čerstvé i konzervované potraviny a zadruhé o hypersalinní vody (Grant 2004). Dalšími místy, které tyto houby obývají jsou již výše zmíněné půdy v aridních oblastech, ledovce, skalnaté oblasti nebo jeskyně.

Ke snížení vodní aktivity u potravin dochází díky přidávání konzervantů (soli nebo cukru), sušením nebo mražením. Potravin, které mohou být napadeny, je velké množství, např. čerstvé i sušené ovoce, maso a zelenina, obiloviny, všechny typy ořechů, mouka pečivo, káva, sýr a další. Mezi nejvýznamnější rody způsobující znehodnocení potravin patří *Aspergillus* a *Penicillium*, přičemž druhy rodu *Penicillium* jsou obecně považovány za více xerofilní. Zajímavým druhem je *Xeromyces bisporus*, který dokáže růst při mnohem nižší

vodní aktivitě, než je běžná hodnota skladovaných potravin (minimální vodní aktivita pro růst *X. bisporus* je 0,61, přičemž např. přidáváním NaCl jako konzervantu, lze dosáhnout vodní aktivity maximálně 0,75). Vyčerpávající přehled xerofilních hub znehodnocujících potraviny podávají Pitt a Hocking (2009).

Jako hypersalinní vody jsou označovány vody s vyšší koncentrací solí než má mořská voda (průměrně 3,5% (Huber et al. 2000)). Hypersalinní vody mohou být rozlišeny na ty, ve kterých zůstává poměr jednotlivých iontů zhruba stejný jako v mořské vodě (tzv. thalassohalinní) a na takové, ve kterých se tento poměr výrazně mění (tzv. athalassohalinní), jejichž příkladem je Mrtvé moře. Druhovú diverzita je vyšší v thalassohalinních vodách. Jedná se o slaná jezera, solné pánve a slané prameny, kde solí s nejvyšší koncentrací je vždy NaCl (Gostinčar et al. 2011). Dlouho se předpokládalo, že tato místa jsou obývána pouze halofilními bakteriemi, ale kolem roku 2000 bylo z tohoto prostředí izolováno mnoho zástupců říše Fungi, nejprve z pobřeží Chorvatska a Slovinska a poté z mnoha míst na celém světě (Gunde-Cimerman et al. 2009). Mezi nejčastěji izolované houby patří tzv. "černé kvasinky". Tyto houby, jejichž kolonie v některých fázích životního cyklu připomínají kvasinky a obsahují v buněčných stěnách melanin (způsobuje jejich černé zbarvení), patřily původně do řádu Dothideales, dnes jsou však řazeny do několika různých řádů. Nejvýznamnějšími černými kvasinkami odolnými vůči osmotickému stresu jsou *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* a *Trimmatostroma salinum*. Dalšími houbami izolovanými z těchto prostředí jsou některé druhy rodu *Cladosporium* a také druh *Aureobasidium pullulans*, který je stále řazen do řádu Dothideales (Tab. 2). Z hypersalinního prostředí jsou rovněž často izolovány druhy rodu *Aspergillus* (*Eurotium*) a *Penicillium*, i když jejich počet není tak vysoký jako na skladovaných potravinách (Butinar et al. 2005, Cantrell et al. 2006). Řád Saccharomycetales zahrnuje velký počet osmotolerantních kvasinek (zejména z čeledí Saccharomycetaceae a Metschnikowiaceae), z nichž některé obývají i hypersalinní prostředí. Nejvýznamnější z nich je *Debaryomyces hansenii* (Gunde-Cimerman et al. 2009).

Z oddělení Basidiomycota je třeba zmínit řád Wallemiales, který obsahuje pouze tři druhy *Wallemia ichthyophaga*, *W. muriae* a *W. Sebi*, které všechny dokáží tolerovat vysoké koncentrace soli a *Wallemia ichthyophaga* dokonce vyžaduje ke svému růstu alespoň 1,7 M (10%) NaCl, což je naprosto neobvyklé mezi všemi Eukaryoty (Zalar et al. 2005). V roce 2013 byl popsán blízce příbuzný řád Geminibasidiales, který spolu s řádem Wallemiales tvoří třídu Wallemiomycetes. I v tomto řádu se vyskytují pouze xerotolerantní druhy (Nguyen et al. 2013).

Tabulka 2 shrnuje taxonomickou klasifikaci xerotolerantních a osmotolerantních

druhů hub. Ze 120 řádů oddělení Ascomycota a Basidiomycota (Kirk et al. 2008) se tyto skupiny vyskytují jen v 17 z nich. Řádem s nejvíce druhy schopnými tolerovat nízkou vodní aktivitu substrátu je řád Eurotiales. Uvádí se, že kolem 70% druhů z rodů *Penicillium* a *Aspergillus* dokáže růst při koncentraci 20% NaCl (Tresner et Hayes 1971). Zajímavého faktu si všimli de Hoog et al. (2005), totiž že v řádech, do kterých patří xerotolerantní druhy, se vyskytují i oportunní patogeni teplokrevných živočichů a člověka. Tyto vlastnosti se však většinou vzájemně vylučují na druhové úrovni, takže autoři předpokládají, že osmotolerance je primitivním společným znakem (plesiomorfie) těchto řádů a později v závislosti na prostředí docházelo ke speciaci buď směrem k osmofilnímu charakteru, nebo k patogennímu způsobu života.

Tabulka 2. Přehled řádů z oddělení Ascomycota a Basidiomycota, ve kterých se vyskytují osmotolerantní zástupci (Gunde-Cimerman et al. 2006).

oddělení	řád	příklady druhů
Ascomycota	Capnodiales	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Hortaea werneckii</i> , <i>Phaeotheca triangularis</i>
	Dothideales	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	Eurotiales	<i>Aspergillus</i> , <i>Emericella</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> , <i>Xeromyces bisporus</i>
	Helotiales	<i>Trimmatostroma salinum</i>
	Hypocreales	<i>Fusarium</i>
	Chaetothyriales	<i>Exophiala dermatitidis</i>
	Microascales	<i>Pseudallescheria boydii</i>
	Onygenales	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>Chrysosporium farinicola</i> , <i>Gymnascella marismortui</i>
	Pleosporales	<i>Alternaria mouchacca</i> , <i>Dendryphiella salina</i> , <i>Ulocladium chlamydosporum</i>
	Saccharomycetales	<i>Candida famata</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	Schizosaccharomycetales	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Basidiomycota	Geminibasidiales	<i>Basidioascus</i> , <i>Geminibasidium</i>
	Polyporales	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	Sporidiales	<i>Rhodospodium sphaerocarum</i>
	Sporidiobolales	<i>Rhodotorula laryngis</i>
	Tremellales	<i>Trichosporon mucoides</i>
	Wallemiales	<i>Wallemia ichthyophaga</i>

4. Ekonomický význam a patogenita osmotolerantních organismů z říše Fungi

Existuje řada důvodů, proč studovat osmotolerantní a osmofilní houby. I když obecně není využití osmotolerantních organismů v biotechnologii příliš vysoké, najdou se příklady i v říši Fungi, např. klasická výroba sójové omáčky, při které je využíván *Aspergillus sojae* (Wei et al. 2013). Mezi osmotolerantními houbami se vyskytují druhy, které jsou schopné využívat některé nebezpečné látky jako zdroj uhlíku a tak je odstraňovat z prostředí. Mohly by tedy být použity pro odstranění těchto látek (např. fenolických) z vody nebo půdy (Leitao et al. 2012).

Halofilní organismy mohou být také chápány jako zdroj genů, které by mohly vylepšit vlastnosti hospodářsky významných plodin (Gunde-Cimerman et al. 2009). Mezi proteiny, které by mohly zvýšit osmotoleranci rostlin patří zejména transportéry kationtů a proteiny pro tvorbu kompatibilních solutů. Oblasti se zasolenou půdou se po celém světě stále rozšiřují, ale zatím se metodami klasického křížení nepodařilo vyšlechtit dostatečně suchu odolné odrůdy významných plodin. Řešením by v budoucnu mohly být transgenní rostliny s geny pocházejícími od halofilních hub (Ashraf et Akram 2009).

Schopnosti vyrovnat se s osmotickým stresem zřejmě slouží jako preadaptace pro patogenitu, takže pochopení mechanismů osmotolerance nám může pomoci objasnit i způsob, jakým se tyto houby vyrovnávají s podmínkami v lidském těle (de Hoog et al. 2005).

Hospodářsky nejvýznamnější jsou druhy znehodnocující potraviny. Potraviny, které jsou napadány různými druhy hub a bakterií mohou být rozděleny na dvě základní skupiny. Do první skupiny patří čerstvé a rychle se kazící, které mají vyšší vodní aktivitu a jsou tedy snáze napadnutelné i méně xerofilními druhy. Jedná se zejména o ovoce, zeleninu a mléčné výrobky. Druhou skupinu tvoří skladované a zpracované potraviny, které jsou různým způsobem konzervované, např. skladované obilí, ořechy, koření, káva a sušené maso. Specifickým případem jsou tzv. koncentrované potraviny, obsahující vysokou koncentraci cukru (marmelády, medy, cukrářské výrobky a sušené ovoce), nebo soli (nasolené maso, ryby) (Pitt et Hocking 2009). Mezi klasické metody konzervace patří sušení, mražení, přidávání soli nebo jiných konzervantů. Moderními metodami konzervace potravin jsou zpracovávání při vysokém tlaku (high-pressure processing), ozařování a krátké vystavení silnému elektrickému poli (pulsed electric fields). Tyto metody jsou sice dražší, ale účinněji hubí přítomné mikroorganismy. (Barbosa-Cánovas et al. 2008).

Houby, způsobující znehodnocení potravin, patří nejčastěji do rodů *Penicillium*,

Aspergillus, *Eurotium*, *Alternaria*, *Fusarium* a *Cladosporium*. Mezi nejvíce xerofilní druhy, které dokáží napadat i potraviny s vodní aktivitou 0,6 patří *Xeromyces bisporus* a kvasinka *Zygosaccharomyces rouxii* (Pitt et Hocking 2009). Tyto druhy neprodukují mykotoxiny, ale během svého růstu na substrátech s nízkou vodní aktivitou produkují metabolickou vodu, čímž vytvářejí příznivější podmínky pro růst druhů, které již nebezpečné mykotoxiny produkovat mohou (Hubka et al. 2013).

Spory a konidie mnoha osmotolerantních hub mohou působit jako alergeny. Vyskytují se ve vzduchu po celý rok v koncentracích stokrát až tisíckrát vyšších než pylová zrna (Horner et al. 1995). Jako příklad hub s alergenními sporami vyskytujícími se ve venkovním vzduchu ("outdoor fungi") lze uvést rody *Alternaria*, *Cladosporium* a *Fusarium* (Kurup et al. 2000). Houby, které se nejčastěji vyskytují v domácnostech ("indoor fungi") patří do rodů *Aspergillus* a *Penicillium* (Meklin et al. 2004). Tyto houby se podílejí na vzniku tzv. Syndromu nezdravých budov (Sick building syndrome) (Cooley et al. 1998).

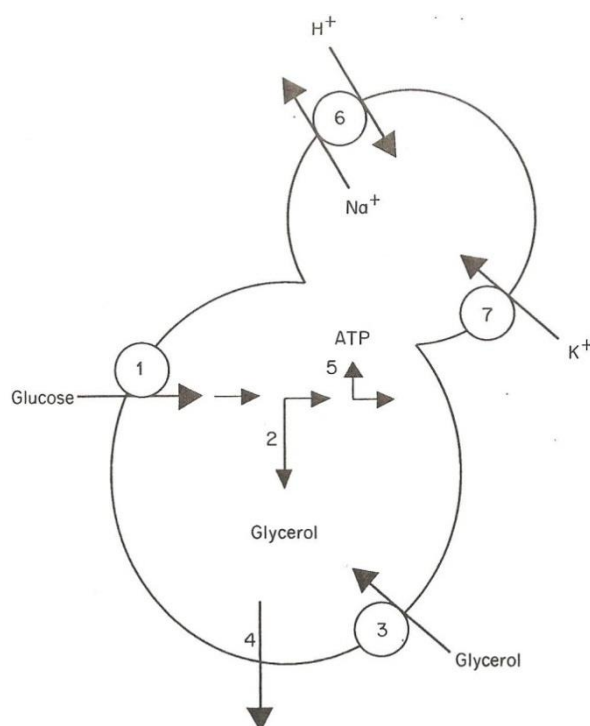
Některé osmotolerantní houby jsou také významnými oportunními patogeny, např. Druhy rodu *Aspergillus*, které působí systémové i povrchové mykózy (Balajee et al. 2009, Hubka et al. 2012). *Hortaea werneckii* způsobuje kožní onemocnění tinea nigra, při kterém houba napadá pouze nejsvrchnější vrstvu kůže (*stratum corneum*) a neinvaduje do živé tkáně (Zalar et al. 1999).

5. Adaptace hub k vodnímu stresu

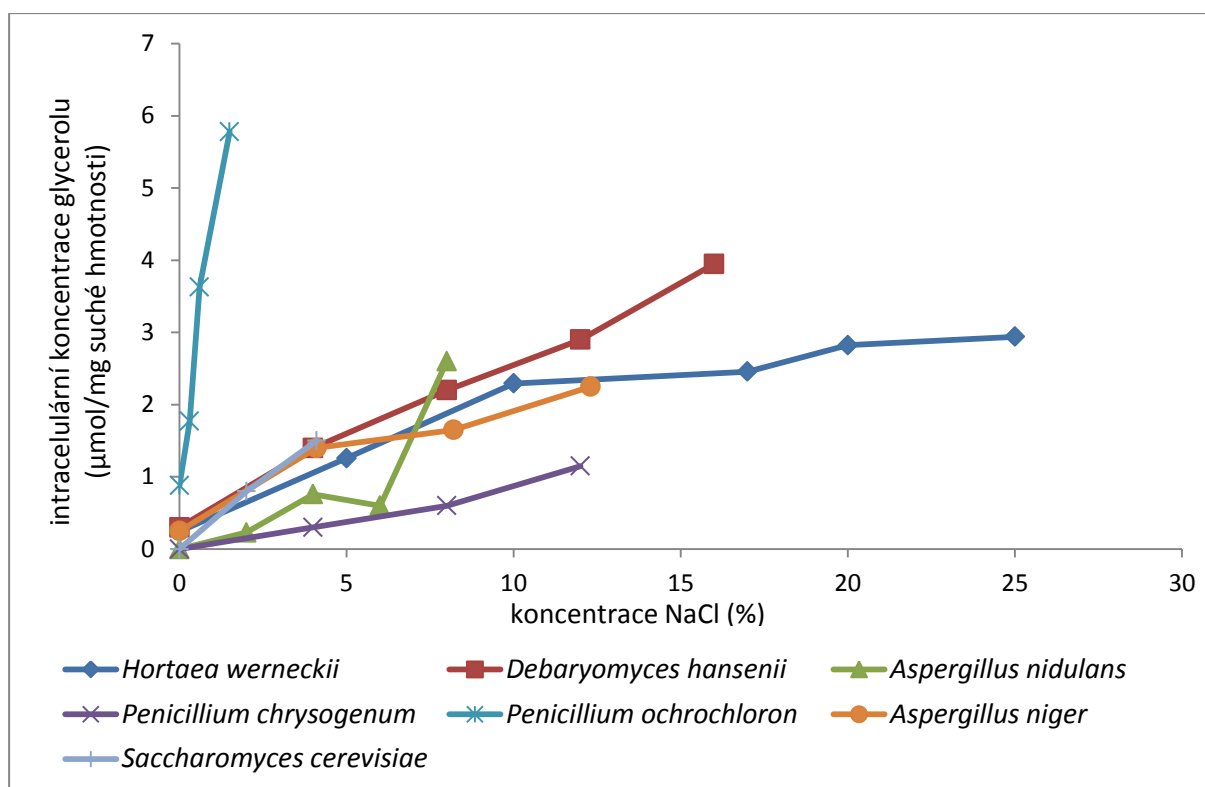
Existují dvě strategie pro vypořádání se s osmotickým stresem. První z nich je udržování vysoké intracelulární koncentrace solí, která je ekvivalentní s okolním prostředím (tzv. "salt-in" strategie). Všechny části buňky musí být na takové koncentrace adaptovány. Tuto strategii využívají osmotolerantní zástupci z domén Bacteria a Archaea. Soli, které se nacházejí v cytoplazmě se většinou liší od těch přítomných v prostředí, nejběžnějším případem je vysoká extracelulární koncentrace NaCl a intracelulární KCl. Druhou možností je vyrovnání osmotického tlaku vysokou koncentrací kompatibilních solutů (Brown et Simpson 1972), přičemž koncentrace solí v cytoplazmě zůstává nízká a odpadá nutnost adaptace všech součástí buňky. Tuto strategii využívají všichni osmotolerantní zástupci říše Fungi (Oren 1999).

Kompatibilní soluty, někdy nazývané osmolyty (Yancey et al. 1982), se dají charakterizovat jako organické neutrální sloučeniny s nízkou molekulární hmotností, které jsou rozpustné ve vodě ve vysokých koncentracích a jejichž přítomnost neovlivňuje (nebo

ovlivňuje co nejméně) aktivitu enzymů. Organismy je získávají buď transportem z okolního prostředí, nebo syntézou *de novo*. Patří mezi ně polyhydroxyalkoholy (např. glycerol, erythritol, arabitol, mannitol), sacharidy (např. sacharóza, trehalóza) a aminokyseliny a jejich deriváty (např. prolin, glycín-betain). Hlavním kompatibilním solutem bývá glycerol, jehož syntéza je pro buňku z energetického hlediska nejvýhodnější (Jennings et Burke 1990, Oren 1999). Proto patří syntéza glycerolu, jeho příjem z prostředí a zabránění jeho úniku z buňky mezi nejběžnější mechanismy adaptace na osmotický stres (schématicky znázorněno na obr. 2). Důkazem, že je glycerol nejdůležitějším kompatibilním solutem, je nárůst intracelulární koncentrace glycerolu se snižující se vodní aktivitou u různých hub, jak můžeme vidět na obrázku 3. Buněčné signalizaci a následné syntéze glycerolu se podrobněji věnuje kapitola o molekulární podstatě adaptací.



Obrázek 2. Schématické znázornění buněčných funkcí při osmoregulaci. (1) příjem zdroje energie; (2) produkce osmolytu (glycerolu); (3) příjem glycerolu z prostředí; (4) transport glycerolu ven z buňky (vyrovnání potenciálu po přesunu do hypoosmotického prostředí); (5) produkce energie; (6) transport iontů Na⁺ ven z buňky; (7) transport K⁺ iontů do buněk (více o gradientu K⁺/Na⁺ a homeostáze iontů v kapitole 6.) (Blomberg et Adler 1992).



Obrázek 3. Nárůst intracelulární koncentrace glycerolu v závislosti na koncentraci NaCl v růstovém médiu. Převzato a upraveno podle Adler et al. (1982), Gadd et al. (1984), Adler et al. (1985), Beever a Laracy (1986), Blomberg a Adler (1989), Blomberg a Adler (1992), Plemenitaš et al. (2008).

Co dělá glycerol tak výhodným kompatibilním solutem, je především jeho nízká molekulární hmotnost a nízké energetické nároky na syntézu. Malá velikost molekuly se ale zároveň ukazuje jako problém, protože glycerol do jisté míry uniká z buněk difuzí přes cytoplazmatickou membránu. Několik studií se snažilo zjistit obecný vliv změn vodní aktivity substrátu na složení cytoplazmatické membrány. Vždy docházelo ke změnám v zastoupení fosfolipidů a také poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin, ale tyto změny se u jednotlivých druhů lišily (Turk et al. 2004). Za adaptivní by se dal označit poměr obsahu sterolů ku fosfolipidům, který zásadním způsobem ovlivňuje fluiditu membrány. Obecně se dá říci, že při nižším poměru sterolů ku fosfolipidům se fluidita membrány zvyšuje a ztráty glycerolu do extracelulárního prostoru rostou. Naopak vyšší poměr sterolů ku fosfolipidům snižuje fluiditu membrány a zabraňuje úniku glycerolu.

Poměr se rychleji měnil ve prospěch sterolů u osmosenzitivních druhů, nejvíce u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Naopak u osmotolerantních a osmofilních druhů se tento poměr udržoval i při nižší vodní aktivitě na nízké hodnotě, což sice znesnadňuje udržení

glycerolu v buňce, ale udržuje fluidní membránu (Turk et al. 2004). Houby, které udržují nízký obsah sterolů, mají buď jiné mechanismy na udržení glycerolu v buňce (u černých kvasinek k tomu zřejmě přispívá melanin – více v kapitole 6.2.4.), nebo se hlavním kompatibilním solutem stává jiná látka, pro kterou není difuze přes cytoplazmatickou membránu tak snadná, např. arabitol, který byl zjištěn u blíže neurčeného osmotolerantního zástupce rodu *Fusarium* (Smolyanyuk et al. 2013).

6. Molekulárně genetická podstata adaptací

6.1. Modelové organismy a metody studia

Studium genetického pozadí osmotolerance bylo započato u kvasinek (García et al. 1997). U *Saccharomyces cerevisiae* je známo nejvíce genů ovlivňujících osmotoleranci a proces signalizace je u ní prozkoumán nejpodrobněji (Hohmann 2002). Studium osmotolerance *S. cerevisiae* má několik nevýhod. *Saccharomyces cerevisiae* nevytváří tak komplexní struktury jako vláknité houby, dá se tedy předpokládat, že i signalizace a odpověď na stres není tak komplexní (což je obecný problém při studiu jakýchkoliv genů u kvasinek). Především se ale jedná o organismus s pouze nízkou tolerancí k osmotickému stresu a z toho vyplývá, že se získané poznatky nedají zcela aplikovat na vysoce osmotolerantní, nebo dokonce osmofilní organismy (Hooley et al. 2003). Kvůli tomu se ke studiu osmotolerance začala využívat také kvasinka *Debaryomyces hansenii*, která dokáže růst v podmínkách s mnohem nižší vodní aktivitou (Breuer et Harms 2006). Další kvasinky využívané ke studiu osmotolerance jsou například *Schizosaccharomyces pombe* (Ohmiya et al. 1995) nebo *Zygosaccharomyces rouxii* (Watanabe et al. 1995).

Studie se zástupci vláknitých hub přinášejí výsledky lépe aplikovatelné na většinu osmotolerantních hub. Zároveň je ale manipulace s organismy náročnější a je nutné pracovat s méně prozkoumanými a upravenými genomy, než je tomu u kvasinek. Jedním z prvních takových organismů byl *Aspergillus nidulans* (Clement et al. 1999). Dalšími významnými modelovými organismy jsou *Neurospora crassa* (Martins et al. 2013), druhy rodu *Wallemia* (Padamsee et al. 2012) a *Hortaea werneckii* (Plemenitaš et al. 2008). *Wallemia ichthyophaga* a *H. werneckii* byly díky svému extrémně halofilnímu, respektive halotolerantnímu charakteru vybrány pro sekvenaci celých genomů, která byla nedávno dokončena (Lenassi et al. 2013, Zajc et al. 2013).

Klasickou genetickou metodou studia využívanou i v tomto případě, je inaktivace

genu důležitého pro osmotoleranci ("knockout" genu) a pozorování mutantního fenotypu (Borgia et Dodge 1992). Další metodou je porovnávání nově osekvenovaných genomů s již upravenými (anotovanými) genomy a hledání homologů genů významných pro osmotoleranci (Miskei et al. 2009). S oběma předchozími metodami souvisí také obnovení původní funkce vnesením plazmidu s předpokládaným homologickým genem z jiného organismu a pozorování, jestli bude původní funkce obnovena (Furukawa et al. 2005). Lze také provádět porovnávání transkriptomů druhu při různé vodní aktivitě média ke zjištění, které geny jsou aktivovány nebo vypínány (Hagiwara et al. 2009).

Tabulka 3. Optimální a maximální tolerované koncentrace NaCl v médiu u modelových organismů.

Název	optimum	maximum	autor
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 M NaCl	1,2 M NaCl	(Onishi 1963)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1 M NaCl	3 M NaCl	(Prista et al. 2005)
<i>Aspergillus nidulans</i>	0,5 M NaCl	3,4 M NaCl	(Beever et Laracy 1986)
<i>Hortaea werneckii</i>	1,5-3 M NaCl	5,0 M NaCl	(Plemenitaš et al. 2008)
<i>Wallemia ichthyophaga</i>	3,5-4,5 M NaCl	5,2 M NaCl	(Zalar et al. 2005)

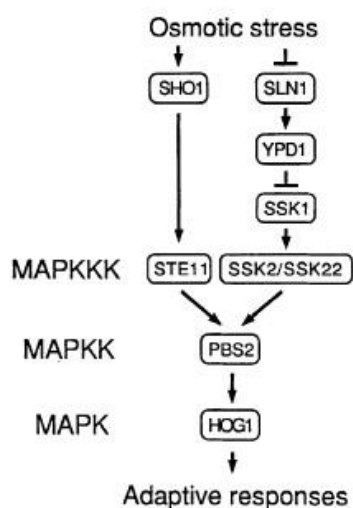
6.2. *Signalizace a odpověď na osmotický stres*

6.2.1. Signalizační dráha HOG (High Osmolarity Glycerol response)

Již bylo zmíněno, že základní odpovědí na osmotický stres u hub je hromadění kompatibilních solutů a nejdůležitějším z nich je glycerol. Enzymem, který je zásadní pro tvorbu glycerolu, je glycerol-3-fosfát dehydrogenáza. Ten je kódován genem GPD1 a jeho transkripce je regulována MAP kinázovou dráhou HOG (Albertyn et al. 1994). MAP kinázové (Mitogen Activated Protein kinase) signální dráhy jsou velmi konzervované napříč všemi eukaryotickými organismy, jsou vždy tvořeny třemi enzymy MAPKKK (kináza kinázy MAP kinázy), MAPKK (kináza MAP kinázy) a MAPK (MAP kináza) a účastní se mnoha důležitých buněčných procesů, kromě jiného také signalizace navazující na stresové podněty z prostředí (Pearson et al. 2001). Stresové faktory, na které HOG dráha reaguje, nemusejí být pouze osmotického charakteru, ale je to také oxidativní stres, reakce na těžké kovy nebo kyselinu citronovou (Bilsland et al. 2004, Lawrence et al. 2004, Sotelo et Rodríguez-Gabriel 2006).

6.2.2. *Saccharomyces cerevisiae* a *Debaryomyces hansenii*

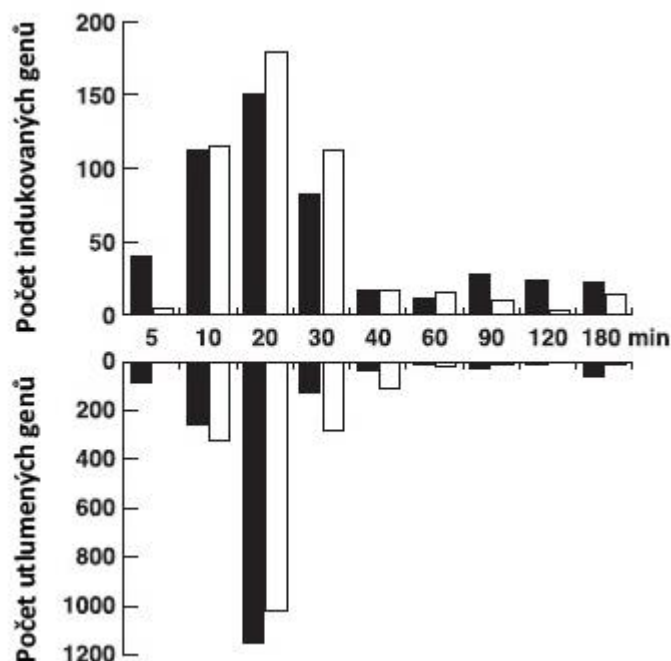
Kináza MAP kinázy Pbs2 je u *S. cerevisiae* aktivátorem genu Hog1 a k její aktivaci vedou dvě samostatné signální větve Sln a Sho (Brewster et al. 1993). Tyto větve jsou navzájem zastupitelné, takže mutace v jedné větvi nezpůsobí ztrátu osmotolerance. Pokud jsou však mutovány obě větve, kvasinka vykazuje tzv. osmosenzitivní fenotyp a není schopná růst ani při malém snížení aktivity vody v médiu (Hohmann 2002). U Sln větve funguje jako osmosenzor histidinová kináza Sln1 (Posas et al. 1996), u větve Sho není přesný mechanismus přenosu signálu z extracelulárního prostředí do buňky znám, protože se ho účastní větší množství proteinů (Krantz et al. 2006), za osmosenzory jsou považovány transmembránové proteiny Hkr1 a Msb2 (Tatebayashi et al. 2007). Schéma signální dráhy HOG u *S. cerevisiae* je znázorněno na obr. 4.



Obrázek 4. Schématický náčrt signální dráhy HOG u *Saccharomyces cerevisiae* (Posas et Saito 1998).

Aktivovaný (fosforylovaný) Hog1 se přesune do jádra, kde ovlivňuje transkripční faktory (Sko1p, Hot1p, Msn2p/Msn4p) genů důležitých pro vyrovnání se s osmotickým stresem. Transkripční faktory působí např. na geny pro syntézu glycerolu – GPD1, GPP2 (glycerol-3-fosfatáza); dále na geny pro transport glycerolu přes membránu, např. STL1 (sugar transporter-like protein); membránové pumpy pro odstraňování sodíkových kationtů z buňky, např. ENA1, HAL1 (Hooley et al. 2003, Miskei et al. 2009, Duran et al. 2010).

O'Rourke a Herskowitz (2004) se pokusili zjistit celkový počet genů ovlivněných osmotickým stresem. Pro snížení vodní aktivity byla použita média s přidáním 0,5 M KCl (37 g/l) a 1 M sorbitolu (182 g/l). Celkem bylo identifikováno 488 indukovaných a 1789 utlumených genů (transkripce zvýšena, respektive snížena alespoň dvakrát), z toho 579 genů bylo ovlivněno MAP kinázou Hog1 (viz obr. 5).



Obrázek 5. Počet indukovaných a utlumených genů u *Saccharomyces cerevisiae* po vystavení osmotickému stresu. Každý gen je zobrazen pouze v čase, kdy byla jeho transkripce nejvíce změněna. Osmotický stres byl způsoben přidáním 0,5 M KCl (černé sloupce) a 1 M sorbitolu (bílé sloupce) (O'Rourke et Herskowitz 2004).

Pro správnou funkci HOG dráhy je také nutná negativní regulace, aby signalizace nezůstávala stále aktivní. O to se starají fosfatázy, které defosforylují Hog1 v jádře (Ptp2 a Ptp3) a v cytosolu (Ptc1, Ptc2 a Ptc3 (Saito et Tatebayashi 2004)).

Kromě syntézy kompatibilních solutů se buňka také potřebuje zbavovat škodlivých sodíkových kationtů a udržovat vhodný poměr Na^+/K^+ . To zajišťují ATPázové pumpy ENA1 a HAL1, které jsou částečně pod kontrolou signální dráhy HOG. Jejich exprese je při zvýšené koncentraci NaCl mnohonásobně zvýšena (Rios et al. 1997). Zajímavé je, že byly provedeny pokusy s expresí těchto genů vnesených do genomu huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) (Yang et al. 2001, Kong et al. 2008), rajčete (*Solanum lycopersicum*) (Munoz-Mayor et al. 2008) a dalších plodin. U těchto geneticky modifikovaných rostlin bylo zaznamenáno zvýšení tolerance k NaCl, ne však takové, aby mělo ekonomický význam. Proto se v současné době provádějí transformace rostlin geny mnohem více halotolerantních hub.

Debaryomyces hansenii, je mořská kvasinka, a dokáže se tedy vypořádat s nižší vodní aktivitou než *S. cerevisiae* (Clipson et Jennings 1992). Její genom byl osekvenován v roce 2004 (Dujon et al. 2004). Stejně jako ostatní osmotolerantní houby syntetizuje kompatibilní

solute, mezi její adaptace ale patří také tolerance o něco vyšší intracelulární koncentrace Na^+ , než u ostatních hub, a je proto považována za tzv. "sodium includer" kvasinku (Prista et al. 2005).

V minulosti byly provedeny pokusy o přenesení náhodných částí genomu *D. hansenii* do genomu *S. cerevisiae* pomocí plazmidových vektorů. U některých transformovaných buněk byla zaznamenána výrazně zvýšená tolerance k NaCl. Jako jeden z mechanismů byl určen zlepšený přísun draselných kationtů díky proteinu s funkcí membránového transportéru K^+ iontů (Prista et al. 2002). Obdobně gen DHAL2 (kóduje enzym bisfosfat nukleotidázu) přenesený do genomu *S. cerevisiae* umožňoval kvasince růst až při 1,2 M NaCl v médiu. Tento enzym přeměňuje 3-fosfoadenosin-5-fosfát (PAP) na adenosinmonofosfát (AMP) a anorganický fosfát. Tato reakce je inhibována kationty Na^+ , takže při vysoké koncentraci NaCl v médiu dochází k akumulaci toxického množství PAP v buňce (Aggarwal et al. 2005).

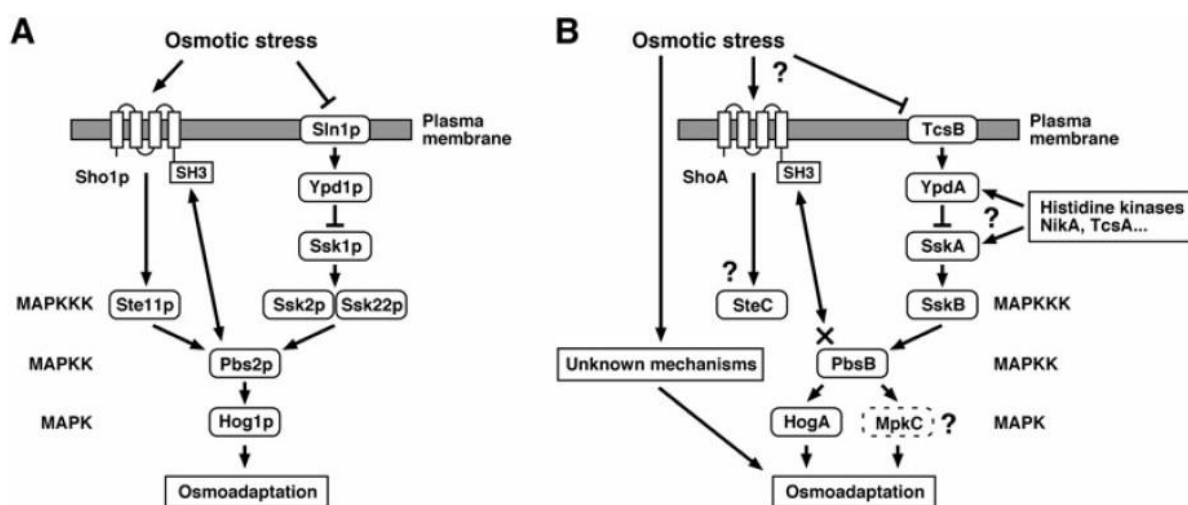
6.2.3. *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans, patřící do řádu Eurotiales, je významným modelovým organismem (Wortman et al. 2009) a byl jednou z prvních vláknitých hub s osekvenovaným genomem (Galagan et al. 2005). Že se jedná o osmotolerantní organismus se zjistilo již poměrně dávno (Clutterbuck 1969). Od té doby byly prováděny pokusy pro zjištění původu osmotolerance. Metodami klasické genetiky bylo zjištěno mnoho genů, po jejichž deleci vykazovaly tyto mutantní kmeny osmosenzitivní fenotyp. Většinou však tyto práce nevedly ke komplexnímu pohledu na osmotoleranci a funkce genů způsobujících osmosenzitivní fenotyp byly spíše předpokládány.

Dalším krokem výzkumu bylo hledání homologů a srovnávání signální dráhy HOG se *S. cerevisiae*. V současné době je dostupných stále více celogenomových sekvencí a je možné hledat najednou homology jednoho proteinu ze *S. cerevisiae* u několika druhů, z nichž některé jsou osmotolerantní a jiné ne. Přítomnost určitého genu v genomu osmotolerantního organismu a nepřítomnost v genomu osmosenzitivního organismu může (i když nemusí nezbytně) ukazovat na důležitost tohoto genu pro osmotoleranci (Miskei et al. 2009).

Nejvýraznější změna v signalizaci ve srovnání se *S. cerevisiae* je signalizace pouze prostřednictvím větve homologické se Sln u *S. cerevisiae*, přestože homology větve Sho se u *A. nidulans* vyskytují také a dříve se předpokládalo, že i tato větev je funkční (Han et Prade

2002). Dráha HOG je i přesto u *A. nidulans* komplexnější než u *S. cerevisiae*. Příčinou této komplexity je vysoká míra zastupitelnosti proteinů účastnících se signalizace a jejich propojení na několika úrovních s dalšími signalizačními dráhami. Příprava osmosenzitivních mutantů není často možná jen delecí jediného genu, protože funkce chybějícího proteinu může být částečně nebo úplně nahrazena jinými proteiny a signální kaskáda se nepřeruší (Furukawa et al. 2005, Suzuki et al. 2008, Miskei et al. 2009). Srovnání signálních HOG drah u *S. cerevisiae* a *A. nidulans* je znázorněno na obrázku 6.



Obrázek 6. Srovnání drah HOG u *Saccharomyces cerevisiae* (vlevo) a *Aspergillus nidulans*. Větší komplexita dráhy u *A. nidulans* je způsobena zastupitelností jednotlivých proteinů a předpokládanou přítomností jiného, zatím neznámého, mechanismu signalizace (Furukawa et al. 2005).

Celkovými změnami v expresi proteinů se zabývali Kim et al. (2007) a identifikovali 30 proteinů, jejichž exprese se signifikantně změnila při růstu na médiu s přidaným 0,6 M KCl (45 g/l). Několikanásobně se zvýšila exprese genu pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH), který je pod kontrolou HOG dráhy a zároveň se snížila exprese enoláz. Enolázy i GAPDH se účastní glykolýzy a zmíněná regulace vede ke zvýšení koncentrace glycerolu v buňce. Dalšími proteiny se zvýšenou expresí byly tzv. "heat shock" proteiny, které patří k proteinům, účastnících se obecné odpovědi na stres. Jejich funkce by mohla být v transportu kationtů K^+ přes cytoplazmatickou membránu (Kim et al. 2007).

6.2.4. *Hortaea werneckii*

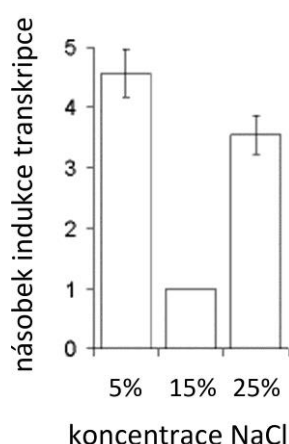
Hortaea werneckii z řádu Capnodiales (dříve Dothideales), patří mezi tzv. "černé kvasinky", které mají v některých fázích vývoje morfologii podobnou kvasinkám z pododdělení Saccharomycotina, ale vytvářejí pigmenty, nejčastěji melanin, způsobující jejich tmavé zbarvení. Tyto houby se často vyskytují v extrémních prostředích a jsou patogeny rostlin i člověka (de Hoog 1993). Druh byl původně popsán jako původce lidského onemocnění dlaní zvaného tinea nigra (de Hoog et Vandenende 1992), ale později bylo zjištěno, že jeho primárním životním prostředím jsou pobřežní oblasti moří s vysokou koncentrací solí, např. solné nádrže. Jedná se o extrémně halotolerantní druh, který je schopen růst prakticky v celém rozsahu koncentrací NaCl, od 0 do 5,1 M (nasycený roztok NaCl ve vodě je při koncentraci zhruba 6 M, v závislosti na teplotě) (Zalar et al. 1999).

Sekvenace genomu, dokončená v roce 2013 (Lenassi et al. 2013), potvrdila celogenomovou duplikaci, kterou předpokládaly již dřívější studie, vzhledem k velkému počtu genů vyskytujících se ve dvou kopiích (Plemenitaš et al. 2008). K této události zřejmě došlo relativně nedávno a hlavním důkazem je přibližně dvojnásobný počet přepisovaných genů než u příbuzných druhů (Lenassi et al. 2013). Duplikace genu je obecně považována za adaptaci ke stresu (Kondrashov et Kondrashov 2006) a u *H. werneckii* je mnoho genů důležitých pro adaptaci na stresové podmínky skutečně přepisováno ve dvou kopiích.

Základní adaptací je stejně jako u dříve zmíněných organismů akumulace kompatibilních solutů, především polyalkoholů glycerolu a erythritolu. Zajímavá je také role melaninu. *Hortaea werneckii* syntetizuje 1,8-dihydroxynaftalenmelanin (Kogej et al. 2004), který při nízkých koncentracích NaCl tvoří tenkou souvislou vrstvu po obvodu buňky a při zvýšené koncentraci NaCl se tvoří velké granule, pokud je ale salinita příliš vysoká, velikost melaninových granulí se opět snižuje. To je pravděpodobně způsobeno tím, že při extrémní salinitě již *H. werneckii* nezvládá produkovat dostatek energie pro jeho tvorbu. Melanin, kromě toho že chrání buňky před vlivem UV záření, které je pro *H. werneckii* v jejím přirozeném mořském prostředí jistě hrozbou, zřejmě vytváří bariéru pro pohyb glycerolu ven z buňky a pomáhá tak udržet jeho vysokou intracelulární koncentraci bez nutnosti snížení fluidity cytoplazmatické membrány (Kogej et al. 2007).

Hlavní roli v odpovědi na osmotický stres opět hraje HOG dráha. U *H. werneckii* jsou funkční obě signální větve Sln i Sho. HOG dráha u *H. werneckii* je zřejmě nejvíce komplexní ze všech dosud zkoumaných organismů (Plemenitaš et al. 2008). Zajímavé je, že MAP kináza Hog1 se vyskytuje pouze v jedné kopii a míra její transkripce v závislosti na snižující se vodní

aktivitě není lineární, ale má tvar U (obr. 7). Nejvyšší je při koncentracích 5% a 25% NaCl v médiu a nejnižší při koncentraci 15% NaCl (Lenassi et al. 2007).



Obrázek 7. Exprese MAP kinázy HwHog1 při různých koncentracích NaCl (Lenassi et al. 2007).

Vaupotič a Plemenitaš (2007) identifikovali 95 genů, jejichž exprese byla změněna alespoň dvakrát v reakci na osmotický stres. Většinu z nich tvořily geny pro základní metabolismus a produkci energie, která je zásadní pro strategii kompatibilních solutů. Pro 13 z 95 genů nebyl nalezen žádný dosud známý homolog u modelových organismů.

Narozdíl od kvasinky *D. hansenii*, udržuje *H. werneckii* nízkou intracelulární koncentraci kationtů Na^+ ("NaCl excluder"). (Kogej et al. 2005). Sekvence genomu *H. werneckii* odhalila několikanásobné zvýšení počtu homologů membránových transportérů oproti *S. cerevisiae*. Těchto proteinů se nachází v genomu *H. werneckii* dvakrát až osmkrát více i v porovnání s blízce příbuznou (ale podstatně méně halotolerantní) houbou *Mycosphaerella graminicola*. Tyto transportéry udržují co možná nejpríznivější poměr K^+/Na^+ (Lenassi et al. 2013).

Také homolog jednoho z typů ATPázy (Pma1), která pumpuje protony přes cytoplazmatickou membránu je zmnožen čtyřikrát v genomu *H. werneckii*, což potvrzuje důležitost tvorby energie pro transport ve stresových podmínkách. Tato ATPáza by stejně jako dříve zmíněné transportéry kationtů K^+ a Na^+ mohla být využita pro vylepšení osmotolerance u rostlin (Lenassi et al. 2013).

6.2.5. *Wallemia ichthyophaga*

Wallemia ichthyophaga je jedním ze 3 druhů řádu Wallemiales a je označována jako nejvíce halofilní eukaryotický organismus, který k růstu potřebuje koncentraci NaCl v médiu alespoň

1,7 M (10%) (Zalar et al. 2005). To z něj činí ideální model pro studium halofilie u eukaryot. Druh byl sice popsán teprve v roce 2005 a mechanismy adaptace nejsou zatím příliš prozkoumány, ale již v roce 2013 byla dokončena sekvenace jeho genomu (Zajc et al. 2013). Zajímavé je srovnání s genomem extrémně halotolerantního druhu *H. werneckii*. Hlavním kompatibilním solutem je i u *W. ichthyophaga* glycerol (Zajc et al. 2014), ale určitou roli v adaptaci na vysoké koncentrace NaCl hraje také buněčná stěna a její remodelace (viz kapitola 7.1., obr. 9).

Wallemia ichthyophaga se od *H. werneckii* odlišuje již velikostí genomu. Narozdíl od rozsáhlého genomu *H. werneckii*, jehož velikost je 51,6 Mbp (Lenassi et al. 2013), se dá genom *W. ichthyophaga* označit jako kompaktní a obsahuje jen 9,6 Mbp (Zajc et al. 2013). U *W. ichthyophaga* je patrný tlak na co nejmenší velikost genomu, repetitivní sekvence představují pouze 1,67% a předpokládaný počet protein kódujících genů je 4 900 oproti 23 000 u *H. werneckii*.

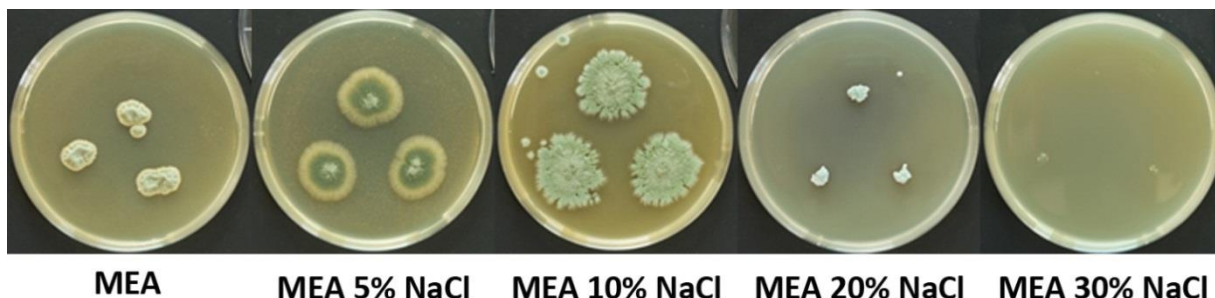
Narozdíl od *H. werneckii* se homolog Hog1 vyskytuje ve dvou kopiích, jejichž transkripce má stejně jako u *H. werneckii* U profil (Konte et Plemenitaš 2013). Podobně jako u *H. werneckii* i v genomu *W. ichthyophaga* najdeme více genů kódujících transportéry alkalických iontů, jedná se ale zejména o proteiny pro aktivní transport. Zmnoženy jsou také geny pro hydrofobiny. Jedná se o amfipatické proteiny, s hydrofilními a hydrofobními úseky, které jsou přítomny v buněčné stěně a zřejmě hrají roli při remodelaci buněčné stěny v reakci na změny vodní aktivity okolního prostředí.

Součástí strategie *W. ichthyophaga* je evidentně udržet velikost svého genomu na co nejnížší hodnotě, protože replikace velkého genomu je energeticky náročná a v extrémních podmínkách by mohla příliš prodloužit trvání mitózy. Tím se vysvětluje výskyt proteinových rodin s výrazně sníženým počtem genů, jako transportérů aminokyselin, lipidů, nukleotidů a dalších molekul. Tyto transportéry nejsou zjevně pro tuto houbu životně důležité, nejspíše proto, že se ve svém přirozeném prostředí setkává pouze s minimální kompeticí (Zajc et al. 2013). Doba trvání mitózy je při nízkých koncentracích NaCl čtyřikrát delší než u ostatních halotolerantních hub (např. *H. werneckii* a *A. pullulans*), při vysokých koncentracích už je však *W. ichthyophaga* často jedinou houbou, která stále roste. Při koncentraci 25% NaCl je její doba zdvojení naopak dvakrát rychlejší než u *H. werneckii* (Zajc et al. 2014).

7. Vliv nízké vodní aktivity substrátu na fenotyp hub

7.1. Morfologické změny

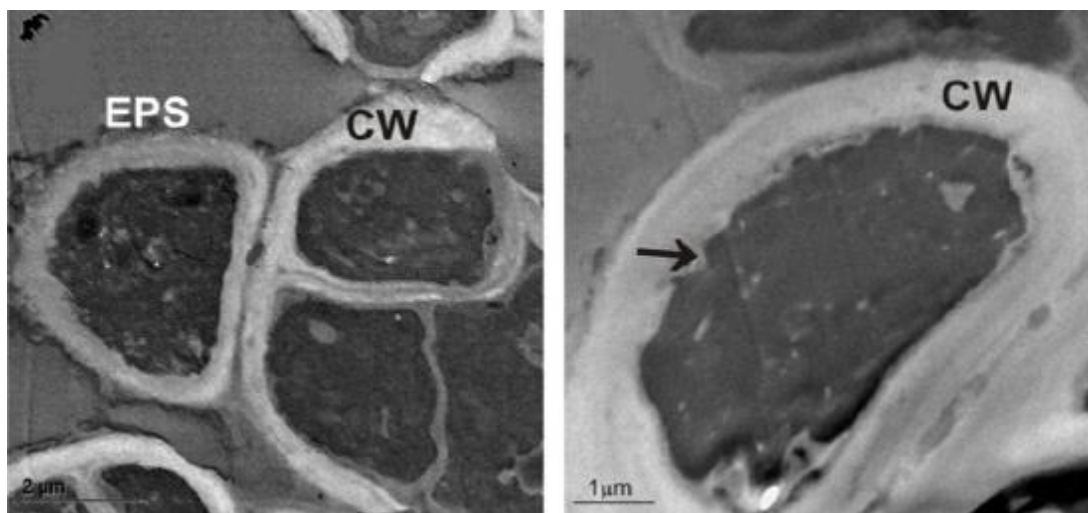
Kromě klíčivosti a rychlosti růstu se v reakci na změny vodní aktivity substrátu mění také morfologie hub. Ke změnám dochází jak na úrovni makromorfologie, tedy tvaru, barvy a okrajů vytvářených kolonií, tak mikromorfologie. Tyto změny se mohou týkat tvaru a velikosti pohlavních i nepohlavních rozmnožovacích struktur, spor nebo konidií (Abu-Seidah 2007). Není jednoznačné do jaké míry lze považovat tyto změny za adaptace, může se jednat o pouhé pasivní reakce na stresové podmínky. Tyto jevy lze jen těžko zobecnit, většina z nich je druhově specifická, např. Zalar et al. (2007) popisuje odlišné změny u druhů rodu *Cladosporium*. Dalším příkladem může být rod *Aspergillus*, kde jsou nejvíce osmotolerantní druhy koncentrovány v sekci *Aspergillus* (dříve rod *Eurotium*) a *Restricti*. Na obr. 8 vidíme změny v morfologii (a rychlosti růstu) u druhu *Aspergillus penicilliioides*.



Obrázek 8. Vliv koncentrace NaCl v médiu na makromorfologii osmotolerantního druhu *Aspergillus penicilliioides* CCF 3282, kultivovaného 3 týdny při teplotě 25°C.

Jednou z morfologických změn, ke které dochází v reakci na nízkou vodní aktivitu substrátu v podstatě u všech organismů je remodelace buněčné stěny. Buněčná stěna je první obrannou linií proti environmentálním stresům a její role je důležitá i při osmotických změnách prostředí. Při hyperosmotickém šoku buňka ztrácí vodu a objem cytoplazmy se zmenšuje, při hypoosmotickém šoku dochází k opačnému procesu. V obou případech je však zásadní pružnost buněčné stěny. Plazmolýza (snížení objemu cytoplazmy jejím částečným oddělením od buněčné stěny), která je typickou reakcí rostlinných buněk na hyperosmotický stres, byla popsána v několika případech i v říši hub, její výskyt ale není příliš častý a dochází k ní většinou až při velmi nízké vodní aktivitě (Bachewich et Heath 1997, Bitsikas et al. 2011). Je možné, že se vyskytuje jen u některých hub, nebo pouze dosud nebyla pozorována. Její význam bude zřejmě menší než v rostlinné říši.

Se snižující se vodní aktivitou se může měnit tloušťka buněčné stěny. U halofilních druhů je buněčná stěna v hyperosmotických podmínkách při pohledu elektronovým mikroskopem výrazně tlustší (obr 9.). Protože většinou nedochází ke zvětšení celkového objemu buňky, zabírá buněčná stěna relativně větší část buněk, zatímco podíl cytoplazmy se zmenšuje. U halotolerantních druhů ztlustění buněčné stěny ve stejných podmínkách ve stejné míře pozorováno nebylo. Rozdíl je nejvíce patrný u halofilního rodu *Wallemia* (obr. 9), ale poprvé byl jev zaznamenán u mořské houby *Dendryphiella salina* (Clipson et al. 1989). Buněčná stěna halofilního druhu *Wallemia ichthyophaga* byla při vysokých koncentracích soli tlustší 1,67 krát (0,6 a 1,6 μm), zatímco zbylé dva druhy *W. muriae* a *W. sebi*, které jsou halotolerantní, nevykazovaly signifikantní změnu (Kunčič et al. 2010). Stejně tomu je i mezi černými kvasinkami. Zatímco u halofilního druhu *Trimmatostroma salinum* ke ztlustění dochází, u halotolerantního druhu *Aureobasidium pullulans* byla buněčná stěna při nižší vodní aktivitě dokonce tenčí (Kogej et al. 2006). Podobně i u mírně halotolerantních druhů *Aspergillus flavus* a *Penicillium roquefortii* byla při vyšší koncentraci soli v médiu buněčná stěna tenčí a výrazně zprohýbaná, ale navíc došlo ke ztlustění cytoplazmatické membrány (Abu-Seidah 2007). Je zapotřebí více studií pro objasnění mechanismu zvyšování tloušťky buněčné stěny a také jeho vlivu na osmotoleranci.



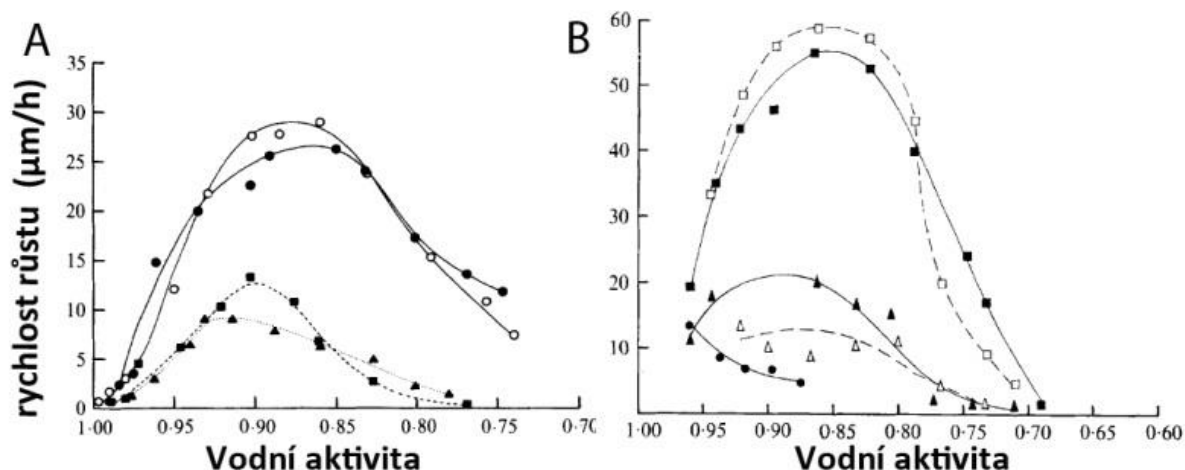
Obrázek 9. Snímky buněk *Wallemia ichthyophaga* z transmisního elektronového mikroskopu. Vlevo na médiu s 15% NaCl, vpravo s 25% NaCl. Na obrázku vpravo můžeme vidět zřetelně tlustší buněčnou stěnu, šipka ukazuje na zářezy v buněčné stěně při vyšší salinitě média. CW – buněčná stěna, EPS – extracelulární polymerické látky (Kunčič et al. 2010).

Kunčič et al. (2010) uvádí ještě další morfologické změny rodu *Wallemia*, které považuje za adaptace. Při nižší vodní aktivitě vytváří *W. ichthyophaga* několikabuněčné shluky (multicellular clumps) a druhy *W. muriae* a *W. sebi* myceliální pelety. Důvodem tvorby těchto shluků tvořených hustě nahloučenými buňkami je zřejmě co největší snížení povrchu vystaveného okolnímu prostředí. Tyto houby také vytvářejí extracelulární polymerické látky (EPS) (Kunčič et al. 2013). Ty se vyskytují i na povrchu buněčné stěny druhů z jiných extrémních prostředí, např. u endolitických hub z Antarktidy a předpokládá se, že mají ochrannou funkci (Selbmann et al. 2005). Tvorba shluků buněk a přítomnost EPS byla zjištěna i u některých druhů černých kvasinek (Kogej et al. 2006).

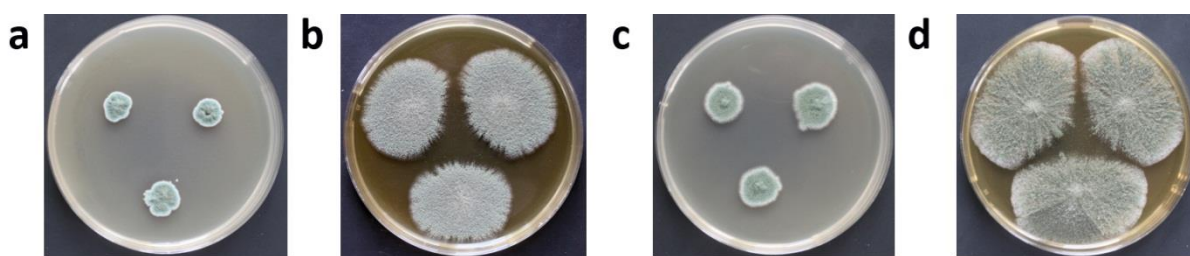
7.2. Vliv různých osmoticky aktivních látek

Látkami využívanými v laboratořích pro snížení vodní aktivity média jsou glycerol, chlorid sodný a sacharóza, glukóza, nebo mix glukózy a fruktózy (Pitt et Hocking 1977, Rosso et Robinson 2001). Vysoké koncentrace solí a cukrů jsou také často příčinou nízké vodní aktivity v přirozených prostředích, např. v hypersalinních vodách nebo v ovoci. Pro dosažení stejné vodní aktivity je zapotřebí různých koncentrací těchto látek.

Scott (1957) předpokládal, že na růst organismů má vliv pouze vodní aktivita a na povaze solutu nezáleží. Tento názor vyvrátili Pitt a Hocking (1977), kteří prokázali, že rychlost růstu i minimální tolerovaná vodní aktivita se u některých druhů mění v závislosti na použitém solutu (viz obr. 10.). Tvrdili však, že schopnost a rychlost růstu je vždy alespoň stejná nebo vyšší na médiích s přidanou směsí glukózy a fruktózy než na médiích s NaCl. Ze závěrů plynulo, že mezi houbami neexistují pravé halofilní organismy. I toto přesvědčení bylo později vyvráceno. Andrews a Pitt (1987) zahrnuli do svých pokusů i druhy, jejichž růst byl stimulován přítomností NaCl (např. *Polypaecilum pisci* a *Basipetospora halophila*), později byla navíc popsána již zmiňovaná *Wallemia ichthyophaga*, která pro svůj růst přítomnost NaCl přímo vyžaduje (Zalar et al. 2005). Zůstává ale pravdou, že některé organismy sice tolerují nízkou vodní aktivitu, ale nedokáží tolerovat vysoké koncentrace toxických Na^+ iontů v okolním prostředí (což způsobí i vysokou intracelulární koncentraci, která inhibuje důležité enzymy). Kationt Na^+ může na některé houby působit inhibičně i při relativně nízkých koncentracích NaCl v médiu (obráz. 10B). Odlišný typ solutu má vliv nejen na růstové parametry, ale i na mikromorfologii (viz kapitola 8., obr. 13) a makromorfologii (obráz. 11), jak ukázaly např. nedávné studie zabývající se rodem *Wallemia* (Kunčič et al. 2013).



Obrázek 10. Odlišný vliv různých solutů na rychlost růstu. (A) halofilní druh *Basipetospora halophila* roste rychleji na médiu s NaCl (o, ● dva odlišné kmeny) než na médiích se stejnou vodní aktivitou, ale s glycerolem (▲), nebo směsí glukózy a fruktózy (■). Opačným případem je *Xeromyces bisporus* (B), jehož rychlost růstu je výrazně vyšší na médiích se směsí glukózy a fruktózy (■ pH=4; □ pH=6,5), než na médiích obsahujících glycerol (▲ pH=4; △ pH=6,5). Na médiu s NaCl (●) byl růst *X. bisporus* inhibován téměř úplně. Převzato a upraveno podle Pitt a Hocking (1977), Andrews a Pitt (1987).



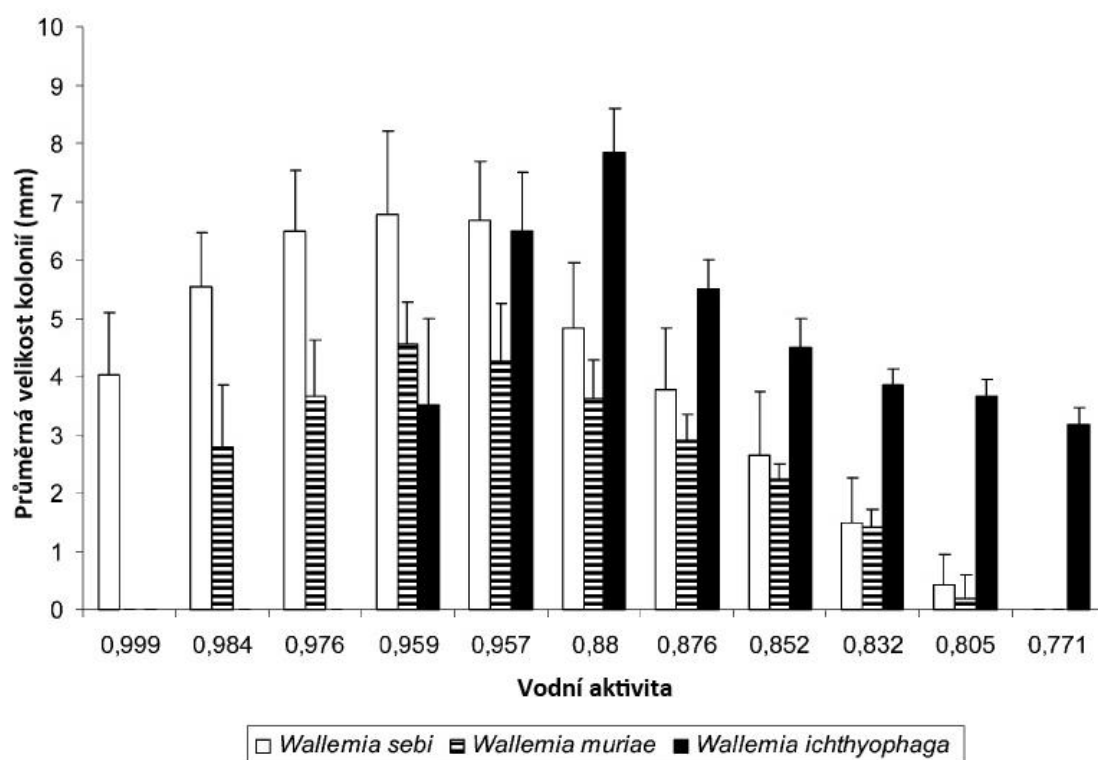
Obrázek 11. Odlišný vliv různých solutů na velikost a tvar kolonií u druhu *Aspergillus penicillioides* CCF 3282 (a, b) a *Aspergillus restrictus* CCF 3364. Média MEA s přidáním 15% NaCl (a, c) a M40Y (b, d), obsahující 400 g sacharózy na litr vody mají velmi podobnou hodnotu vodní aktivity (0,89, respektive 0,90), přesto se vzhled stejného druhu na těchto médiích výrazně liší.

8. Využití osmotolerance v taxonomii

Schopnost růstu na substrátech s definovanou vodní aktivitou je poměrně stabilním druhově specifickým znakem, který může být uplatněn v taxonomii spolu se znaky morfologickými a molekulárně genetickými k podpoře druhového konceptu a k rozlišování druhů. Zjištění minimální a maximální vodní aktivity, při které je daný druh schopný růst nebo tvorba

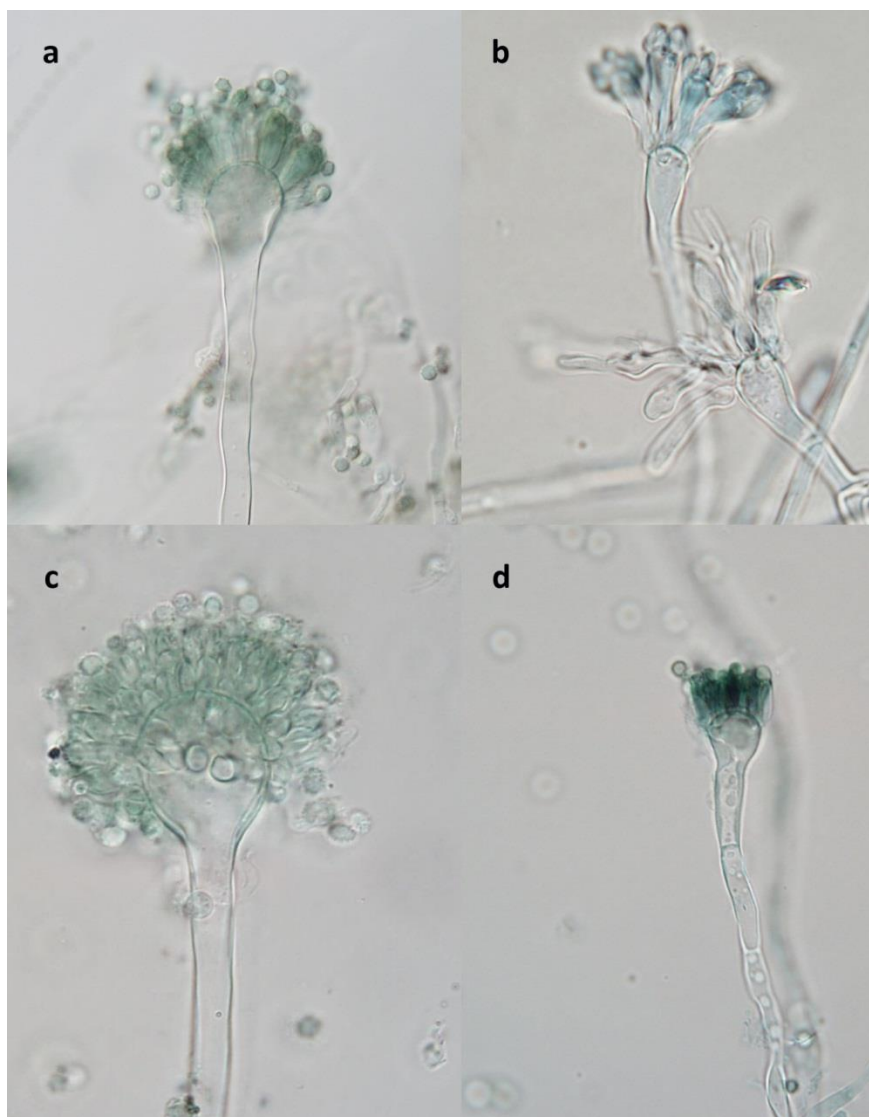
růstových křivek v osmotickém gradientu je ale poměrně časově náročná.

Wallemia, *Cladosporium* a *Aspergillus* jsou příkladem rodů, u kterých byly odlišné růstové parametry na médiích s nízkou vodní aktivitou použity k rozlišení druhů (Zalar et al. 2005, Kobayashi et al. 2012, Hubka et al. 2013) *Wallemia sebi* dokáže růst v rozmezí vodní aktivity od 1 do 0,8, kdy už je její růst velmi limitovaný, zatímco *W. ichthyophaga* roste i v nasyceném roztoku NaCl s vodní aktivitou 0,75. *Wallemia ichthyophaga* navíc nedokáže růst při vodní aktivitě 1 a potřebuje její snížení alespoň na 0,96. Rozpětí růstu na škále vodních aktivit u *W. muriae* je zhruba na pomezí obou dříve jmenovaných druhů. Všechny druhy navíc vykazují optimální růst při různé vodní aktivitě (obr.12) (Zalar et al. 2005).



Obrázek 12. Příklad využití osmotolerance v taxonomii. Růst *Wallemia sebi*, *W. muriae* a *W. ichthyophaga* v závislosti na vodní aktivitě média. Snížení vodní aktivity bylo dosaženo přidáváním NaCl, kolonie byly měřeny po 14 dnech kultivace při teplotě 24°C. Převzato a upraveno podle Zalar et al. (2005).

Problematický může být výběr vhodného média pro sledování mikromorfologie u různých skupin osmotolerantních hub. Změny vodní aktivity média bývají spojeny s výskytem atypií v mikromorfologii (viz obr. 13). Dodržování jednotných setů médií pro popis a determinaci druhů na základě morfologie je základem k vytvoření kvalitní taxonomie těchto skupin a také úspěšné identifikaci.



Obrázek 13. Vliv médií s různou vodní aktivitou na mikromorfologii *Aspergillus penicillioides* (a, b) *Aspergillus restrictus* (c, d). Typické konidiofory na vhodných médiích M40Y (a) a MEA s 20% NaCl (c) a atypické konidiofory na nevhodných médiích CYA (b) a MEA (d). Kultivace probíhala při teplotě 25°C.

Přehled běžných médií používaných pro izolaci a kultivaci osmotolerantních a osmofilních hub je podán v tabulce 4 i s hodnotami vodních aktivit těchto médií. Vodní aktivity médií MEA (Malt extract agar) a PDA (Potato dextrose agar) bývají často upravovány na nižší hodnotu přidáváním definovaných množství NaCl, sacharózy, směsi glukózy a fruktózy, směsi glukózy a sacharózy, nebo glycerolu.

Tabulka 4. Přehled médií běžně používaných pro kultivaci osmotolerantních a osmofilních hub

zkratka	celý název	a_w	Zdroj
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar	0,997	(Hocking et Pitt 1980)
DG18	Dichloran 18% Glycerol Agar	0,946	(Petrovič et al. 2000)
CYA	Czapek yeast extract agar	0,997	(Hocking et al. 2006)
CY20S	Czapek yeast extract agar 20% sucrose	0,980	(Hocking et al. 2006)
PDA	Potato dextrose agar	0,997	(Hocking et Pitt 1980)
MEA	Malt extract agar	0,998	(Baxter et al. 1998)
MEA 15% NaCl	Malt extract agar 15% NaCl	0,900	(Yeoh et al. 2012)
MEA 30% NaCl	Malt extract agar 30% NaCl	0,782	(Petrovič et al. 2000)
MEA 35% sucrose	Malt extract agar 35% sucrose	0,96	(Yeoh et al. 2012)
MEA 70% glycerol	Malt extract agar 70% glycerol	0,62	(Yeoh et al. 2012)
MY5-12	Malt extract yeast extract 5% NaCl 12% glucose	0,960	(Baxter et al. 1998)
MY10-12	Malt extract yeast extract 10% NaCl 12% glucose	0,930	(Baxter et al. 1998)
M40Y	Malt extract yeast extract agar 40% sucrose	0,89	(Petrovič et al. 2000)
MY50G	Malt extract yeast extract agar 50% glucose	0,89	(Pitt et al. 2013)
MY70GF	Malt extract yeast extract agar 70% glucose/fructose	0,723	(Petrovič et al. 2000)

Závěr

Osmotolerantní houby se vyskytují pouze v 17 ze 120 řádů oddělení Ascomycota a Basidiomycota. Nejvíce osmotolerantních druhů obsahuje řád Eurotiales. Všichni zástupci říše Fungi se vyrovnávají s nízkou vodní aktivitou strategií kompatibilních solutů, které v buňce vyrovnávají hyperosmotické extracelulární podmínky a zabraňují tak ztrátě vody. Kompatibilním solutem s nejvyšší koncentrací bývá nejčastěji glycerol, který je pro buňku energeticky nejvýhodnější z hlediska syntézy a příjmu z okolního prostředí, navíc ani při vysoké intracelulární koncentraci nemá vliv na funkci proteinů. Pro signalizaci a odpověď na osmotický stres houby využívají MAP kinázovou signální dráhu HOG (High Osmolarity Glycerol), která indukuje v první řadě syntézu glycerolu jakožto kompatibilního solutu, ale ovlivňuje i celou řadu dalších genů důležitých pro účinnou odpověď na osmotický stres. Další vlastností, kterou musejí osmotolerantní houby disponovat, je schopnost účinného transportu iontů přes membránu pro udržení homeostázy (zejména se jedná o poměr K^+/Na^+ iontů v prostředích s vysokou koncentrací NaCl). Různé osmoticky aktivní látky mohou mít na osmotolerantní houby odlišný vliv. Rychlejší růst je většinou při stejné vodní aktivitě pozorován na médiích se sacharózou nebo glukózou a fruktózou ve srovnání s NaCl. Existují ale i druhy jako *W. ichthyophaga*, které preferují NaCl. Pravá halofilie, kdy organismus k růstu striktně vyžaduje určitou koncentraci NaCl je velmi výjimečná vlastnost v celé doméně Eukaryota. Extrémně halotolerantní *H. werneckii* a halofilní *W. ichthyophaga* jsou v posledních letech využívány jako modelové organismy pro studium osmotolerance. Přestože už bylo vynaloženo mnoho úsilí na objasnění adaptací, celkový obraz zatím není zdaleka kompletní. Důležitým bodem ve výzkumu bylo osekvenování genomů obou zmíněných extremofilních hub, které bylo dokončeno v roce 2013 (Lenassi et al. 2013, Zajc et al. 2013). Tyto i další organismy by mohly být využity jako zdroj genů pro vylepšení halotolerance u hospodářsky významných plodin pomocí genového inženýrství. Schopnost tolerovat podmínky s nízkou vodní aktivitou substrátu je druhově specifická a může být využita jako fenotypový znak v taxonomii u morfologicky špatně rozlišitelných druhů.

Přehled použité literatury

- Abu-Seidah AA (2007). Effect of salt stress on amino acids, organic acids and ultrastructure of *Aspergillus flavus* and *Penicillium roquefortii*. *Int J Agric Biol* **3**: 419-425.
- Adler L, Blomberg A, Nilsson A (1985). Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **162**: 300-306.
- Adler L, Pedersen A, Tunblad-Johansson I (1982). Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiol Plant* **56**: 139-142.
- Aggarwal M, Bansal PK, Mondal AK (2005). Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **22**: 457-470.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**: 4135-4144.
- Andrews S, Pitt JI (1987). Further studies on the water relations of xerophilic fungi, including some halophiles. *J Gen Microbiol* **133**: 233-238.
- Ashraf M, Akram NA (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotech Adv* **27**: 744-752.
- Bachewich CL, Heath IB (1997). Differential cytoplasm-plasma membrane-cell wall adhesion patterns and their relationships to hyphal tip growth and organelle motility. *Protoplasma* **200**: 71-86.
- Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S (2009). Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol* **47**: 3138-3141.
- Barbosa-Cánovas GV, Fontana Jr AJ, Schmidt SJ, Labuza TP (2008). Water activity in foods: fundamentals and applications, John Wiley & Sons.
- Baxter C, Magan N, Lane B, Wildman H (1998). Influence of water activity and temperature on in vitro growth of surface cultures of a *Phoma* sp. and production of the pharmaceutical metabolites, squalenstatins S1 and S2. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 328-332.
- Beever RE, Laracy EP (1986). Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **168**: 1358-1365.
- Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A, Sunnerhagen P (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**: 1743-1756.
- Bitsikas V, Karachaliou M, Gournas C, Dailianas G (2011). Hypertonic conditions trigger transient plasmolysis, growth arrest and blockage of transporter endocytosis in *Aspergillus nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol* **28**: 54-68.
- Blomberg A, Adler L (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **171**: 1087-1092.
- Blomberg A, Adler L (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* **33**: 145-212.

- Borgia PT, Dodge CL (1992). Characterization of *Aspergillus nidulans* mutants deficient in cell wall chitin or glucan. *J Bacteriol* **174**: 377-383.
- Breuer U, Harms H (2006). *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **23**: 415-437.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763.
- Brown AD, Simpson JR (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* **72**: 589-591.
- Butinar L, Zalar P, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N (2005). The genus *Eurotium* - members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiol Ecol* **51**: 155-166.
- Cantrell SA, Casillas-Martinez L, Molina M (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycol Res* **110**: 962-970.
- Clement D, Clipson N, Hooley P (1999). The genetical control of osmotolerance in fungi: A mutation analysis in the ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Mycologist* **13**: 79-82.
- Clipson NJW, Jennings DH (1992). *Dendryphiella salina* and *Debaryomyces hansenii* - models for ecophysical adaptation to salinity by fungi that grow in the sea. *Can J Bot* **70**: 2097-2105.
- Clipson NJW, Jennings DH, Smith JL (1989). The response to salinity at the microscopic level of the marine fungus *Dendryphiella salina* Nicot and Pugh as investigated stereologically. *New Phytol* **113**: 21-27.
- Clutterbuck AJ (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317-327.
- Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Straus DC (1998). Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *J Occup Env Med* **55**: 579-584.
- de Hoog GS (1993). Evolution of black yeasts - possible adaptation to human host. *Anton Leeuw Int J G* **63**: 105-109.
- de Hoog GS, Vandenende A (1992). Nutritional pattern and eco-physiology of *Hortaea werneckii*, agent of human tinea nigra. *Anton Leeuw Int J G* **62**: 321-329.
- de Hoog S, Zalar P, Van Den Ende BG, Gunde-Cimerman N (2005). Relation of halotolerance to human-pathogenicity in the fungal tree of life: an overview of ecology and evolution under stress, Springer.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, de Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, de Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Duran R, Cary JW, Calvo AM (2010). Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins* **2**: 367-381.

- Furukawa K, Hoshi Y, Maeda T, Nakajima T, Abe K (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **56**: 1246-1261.
- Gadd G, Chudek J, Foster R, Reed R (1984). The osmotic responses of *Penicillium ochrochloron*: changes in internal solute levels in response to copper and salt stress. *J Gen Microbiol* **130**: 1969-1975.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma L-J, Wortman JR, Batzoglou S, Lee S-I, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.
- García MJ, Ríos G, Ali R, Bellés JM, Serrano R (1997). Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**: 1125-1131.
- Gock MA, Hocking AD, Pitt JI, Poulos PG (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int J Food Microbiol* **81**: 11-19.
- Gostinčar C, Grube M, de Hoog S, Zalar P, Gunde-Cimerman N (2010). Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS Microbiol Ecol* **71**: 2-11.
- Gostinčar C, Lenassi M, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A (2011). Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. *Adv Appl Microbiol* **77**: 71-96.
- Grant WD (2004). Life at low water activity. *Philos T Roy Soc B* **359**: 1249-1267.
- Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A (2006). Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya, Springer.
- Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitaš A (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res* **113**: 1231-1241.
- Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, Plemenitaš A (2000). Hypersaline waters in salterns—natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 235-240.
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K (2009). Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet Biol* **46**: 868-878.
- Han KH, Prade RA (2002). Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **43**: 1065-1078.
- Hocking AD, Pitt JI (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl Environ Microbiol* **39**: 488-492.
- Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U (2006). *Advances in food mycology*, Springer.
- Hohmann S (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Hooley P, Fincham DA, Whitehead MP, Clipson NJ (2003). Fungal osmotolerance. *Adv Appl Microbiol* **53**: 177-211.
- Horner W, Helbling A, Salvaggio J, Lehrer S (1995). Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev* **8**: 161-179.
- Huber C, Klimant I, Krause C, Werner T, Mayr T, Wolfbeis OS (2000). Optical sensor for seawater salinity. *Fresen J Anal Chem* **368**: 196-202.
- Hubka V, Kolařík M, Kubátová A, Peterson SW (2013). Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia* **105**: 912-937.
- Hubka V, Kubátová A, Mallátová N, Sedláček P, Melichar J, Skořepová M, Mencl K, Lysková P, Šrámková B, Chudíčková M (2012). Rare and new etiologic agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. *Med Mycol* **50**: 601-610.

- Chen AW (1964). Soil fungi with high salt tolerance. *Trans Kans Acad Sci* **67**: 36-40.
- Jennings DH, Burke RM (1990). Compatible solutes—the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytol* **116**: 277-283.
- Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR (2007). Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fungal Genet Biol* **44**: 886-895.
- Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers H (2008). Dictionary of the fungi. 10th edition, CSIRO publishing.
- Kobayashi N, Watanabe M, Hara-Kudo Y (2012). Distinctive identification of *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium halotolerans* based on physiological methods. *J Syst Evol* **50**: 235-243.
- Kogej T, Gorbushina AA, Gunde-Cimerman N (2006). Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycol Res* **110**: 713-724.
- Kogej T, Ramos J, Plemenitaš A, Gunde-Cimerman N (2005). Halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6600-6605.
- Kogej T, Stein M, Volkmann M, Gorbushina AA, Galinski EA, Gunde-Cimerman N (2007). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* **153**: 4261-4273.
- Kogej T, Wheeler MH, Rizner TL, Gunde-Cimerman N (2004). Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Microbiol Lett* **232**: 203-209.
- Kondrashov FA, Kondrashov AS (2006). Role of selection in fixation of gene duplications. *J Theor Biol* **239**: 141-151.
- Kong XQ, Gao XH, Li WH, Zhao JQ, Zhao YX, Zhang H (2008). Overexpression of ENA1 from yeast increases salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Plant Biol* **51**: 159-165.
- Konte T, Plemenitaš A (2013). The HOG signal transduction pathway in the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: identification and characterisation of MAP kinases WiHog1A and WiHog1B. *Extremophiles* **17**: 623-636.
- Krantz M, Becit E, Hohmann S (2006). Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet* **49**: 137-151.
- Kunčič MK, Kogej T, Drobne D, Gunde-Cimerman N (2010). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Appl Environ Microbiol* **76**: 329-337.
- Kunčič MK, Zajc J, Drobne D, Pipan Tkalec Z, Gunde-Cimerman N (2013). Morphological responses to high sugar concentrations differ from adaptation to high salt concentrations in the xerophilic fungi *Wallemia* spp. *Fungal Biol* **117**: 466-478.
- Kurup VP, Shen H-D, Banerjee B (2000). Respiratory fungal allergy. *Microbes Infect* **2**: 1101-1110.
- Lawrence CL, Botting CH, Antrobus R, Coote PJ (2004). Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol* **24**: 3307-3323.
- Leitao AL, Garcia-Estrada C, Ullan RV, Guedes SF, Martin-Jimenez P, Mendes B, Martin JF (2012). *Penicillium chrysogenum* var. *halophenolicum*, a new halotolerant strain with potential in the remediation of aromatic compounds in high salt environments. *Microbiol Res* **167**: 79-89.

- Lenassi M, Gostinčar C, Jackman S, Turk M, Sadowski I, Nislow C, Jones S, Birol I, Cimerman NG, Plemenitaš A (2013). Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *PloS One* **8**: e71328.
- Lenassi M, Vaupotič T, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A (2007). The MAP kinase HwHog1 from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: coping with stresses in solar salterns. *Saline Syst* **3**.
- Leong S-IL, Pettersson OV, Rice T, Hocking AD, Schnurer J (2011). The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* - Growth and competition at various water activities. *Int J Food Microbiol* **145**: 57-63.
- Martins I, Hartmann DO, Alves PC, Planchon S, Renaut J, Leitão MC, Rebelo LP, Silva Pereira C (2013). Proteomic alterations induced by ionic liquids in *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *J Proteomics* **94**: 262-278.
- Meklin T, Haugland RA, Reponen T, Varma M, Lummus Z, Bernstein D, Wymer LJ, Vesper SJ (2004). Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal mold conditions. *J Environ Monitor* **6**: 615-620.
- Miskei M, Karányi Z, Pócsi I (2009). Annotation of stress–response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol* **46**: S105-S120.
- Mueller GM, Bills GF, Foster MS (2004). Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, Academic Press.
- Munoz-Mayor A, Pineda B, Garcia-Abellan JO, Garcia-Sogo B, Moyano E, Atares A, Vicente-Agullo F, Serrano R, Moreno V, Bolarin MC (2008). The HAL1 function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiol Plant* **133**: 288-297.
- Nguyen HDT, Nickerson NL, Seifert KA (2013). *Basidioascus* and *Geminibasidium*: a new lineage of heat-resistant and xerotolerant basidiomycetes. *Mycologia* **105**: 1231-1250.
- O'Rourke SM, Herskowitz I (2004). Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol Biol Cell* **15**: 532-542.
- Ohmiya R, Yamada H, Nakashima K, Aiba H, Mizuno T (1995). Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. *Mol Microbiol* **18**: 963-973.
- Onishi H (1963). Osmophilic yeasts. *Adv Food Res* **12**: 53-94.
- Oren A (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334-348.
- Padamsee M, Kumar T, Riley R, Binder M, Boyd A, Calvo AM, Furukawa K, Hesse C, Hohmann S, James TY (2012). The genome of the xerotolerant mold *Wallemia sebi* reveals adaptations to osmotic stress and suggests cryptic sexual reproduction. *Fungal Genet Biol* **49**: 217-226.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions *Endocr Rev* **22**: 153-183.
- Petrovič U, Gunde-Cimerman N, Zalar P (2000). Xerotolerant mycobiota from high altitude Anapurna soil, Nepal. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 339-342.
- Pitt JI (1975). Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. *In* Water Relations of Foods. R. B. Duckworth. London, Academic Press. **1974**: 273-307.

- Pitt JI, Hocking AD (1977). Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *J Gen Microbiol* **101**: 35-40.
- Pitt JI, Hocking AD (2009). *Fungi and food spoilage*, Springer.
- Pitt JI, Lantz H, Pettersson OV, Leong S-IL (2013). *Xerochrysium* gen. nov. and *Bettsia*, genera encompassing xerophilic species of *Chrysosporium*. *IMA Fungus* **4**: 229-241.
- Plemenitaš A, Vaupotič T, Lenassi M, Kogej T, Gunde-Cimerman N (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Stud Mycol* **61**: 67-75.
- Posas F, Saito H (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* **17**: 1385-1394.
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1–YPD1–SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, García R, Ramos J (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **5**: 693-701.
- Prista C, Soeiro A, Vesely P, Almagro A, Ramos J, Loureiro-Dias MC (2002). Genes from *Debaryomyces hansenii* increase salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* W303. *FEMS Yeast Res* **2**: 151-157.
- Rios G, Ferrando A, Serrano R (1997). Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 515-528.
- Rosso L, Robinson TP (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *Int J Food Microbiol* **63**: 265-273.
- Saito H, Tatebayashi K (2004). Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem* **136**: 267-272.
- Scott WJ (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv Food Res* **7**: 83-127.
- Selbmann L, de Hoog GS, Mazzaglia A, Friedmann EI, Onofri S (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud Mycol* **51**: 1-32.
- Smolyanyuk EV, Bilanenko EN, Tereshina VM, Kachalkin AV, Kamzolkina OV (2013). Effect of sodium chloride concentration in the medium on the composition of the membrane lipids and carbohydrates in the cytosol of the fungus *Fusarium* sp. *Microbiology* **82**: 600-608.
- Sotelo J, Rodríguez-Gabriel MA (2006). Mitogen-activated protein kinase Hog1 is essential for the response to arsenite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**: 1826-1830.
- Suzuki A, Kanamaru K, Azuma N, Kato M, Kobayashi T (2008). GFP-Tagged expression analysis revealed that some histidine kinases of *Aspergillus nidulans* show temporally and spatially different expression during the life cycle. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 428-434.
- Taiz L, Zeiger E (2010). *Plant Physiology*, Ed 5th, Sinauer Associates, USA.
- Tatebayashi K, Tanaka K, Yang HY, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M, Saito H (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the Sho1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* **26**: 3521-3533.
- Tresner HD, Hayes JA (1971). Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Appl Microbiol* **22**: 210-213.
- Turk M, Mejanelle L, Šentjurc M, Grimalt JO, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A (2004). Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles* **8**: 53-61.

- Vaupotič T, Plemenitaš A (2007). Differential gene expression and Hog1 interaction with osmoresponsive genes in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. BMC genomics **8**: 280.
- Watanabe Y, Miwa S, Tamai Y (1995). Characterization of Na⁺/H⁺-antiporter gene closely related to the salt-tolerance of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Yeast **11**: 829-838.
- Wei QZ, Wang HB, Chen ZX, Lv ZJ, Xie YF, Lu FP (2013). Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process. Appl Microbiol Biotechnol **97**: 9111-9119.
- Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D, Bencina M, Braus G, Coutinho P (2009). The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: A community effort. Fungal Genet Biol **46**: S2-S13.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science **217**: 1214-1222.
- Yang SX, Zhao YX, Zhang Q, He YK, Zhang H, Da L (2001). HAL1 mediate salt adaptation in *Arabidopsis thaliana*. Cell Res. **11**: 142-148.
- Yeoh T, Cheah Y, Davies R (2012). Evaluation of injury to *Saccharomyces rouxii* YSa40 cells in low water activity/pH glycerol/CPB stress system. Int Food Res J **19**.
- Zajc J, Kogej T, Galinski EA, Ramos J, Gunde-Cimerman N (2014). Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. Appl Environ Microbiol **80**: 247-256.
- Zajc J, Liu Y, Dai W, Yang Z, Hu J, Gostinčar C, Gunde-Cimerman N (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. BMC genomics **14**: 1-21.
- Zalar P, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N (1999). Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. Stud Mycol: 38-48.
- Zalar P, de Hoog GS, Schroers H-J, Frank JM, Gunde-Cimerman N (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). Antonie van Leeuwenhoek **87**: 311-328.
- Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. Stud Mycol: 157-183.